

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Impact du cuivre sur le cycle cellulaire de *Caulobacter Crescentus*

LOUIS, Gwennaëlle

Award date:
2016

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**IMPACT DU CUIVRE
SUR LE CYCLE CELLULAIRE DE *CAULOBACTER CRESCENTUS***

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Gwennaëlle LOUIS

Janvier 2016

Impact du Cu sur le cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*

LOUIS Gwennaëlle

Résumé

Afin de survivre, les bactéries doivent être capables de s'adapter rapidement à une modification de leur environnement. Une augmentation de la concentration en cuivre (Cu) fait partie des nombreux stress pouvant être rencontrés par les bactéries. Bien que le Cu soit essentiel à la vie à faible concentration, il est également cytotoxique à haute concentration. Cette dualité du Cu nécessite donc une régulation très fine de l'homéostasie du Cu. *Caulobacter crescentus* est une alpha-protéobactérie vivant dans des milieux aquatiques oligotrophes. Dans cette étude, l'impact du Cu sur le cycle cellulaire de *C. crescentus* a été étudié.

Le Cu entraîne un retard de la division de *C. crescentus*. Ce retard vient du fait que la cellule doit diminuer sa concentration intracellulaire en Cu au moment des transitions G1/S (différenciation des cellules flagellées en cellules pédonculées) et G2/M (division des cellules pré-divisionnelles), entraînant ainsi un allongement de ces transitions. PcoA et PcoB, deux protéines impliquées dans l'homéostasie du Cu, jouent un rôle dans la diminution de la concentration intracellulaire en Cu au moment de la transition G1/S. Cependant, un autre système doit également être impliqué lors de l'allongement de la transition G2/M.

Le Cu pourrait induire un stress oxydatif dans la cellule entraînant des dommages à l'ADN. Le système de réponse au stress SidA et DidA pourrait être impliqué dans l'allongement de la transition G2/M afin de permettre à la cellule de réparer ces dommages à l'ADN avant de se diviser. Le Cu entraîne également un retard dans la localisation au centre de la cellule de la protéine de division FtsZ, impliquée dans la première étape de la division. Finalement, un crible a été réalisé afin de chercher d'autres acteurs pouvant être impliqués dans cette transition G2/M.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2016

Promoteur: J.-Y. Matroule

Remerciements

Je remercie tout d'abord Monsieur Jean-Yves Matroule, mon promoteur durant ce mémoire, pour m'avoir donné la chance de le réaliser dans son unité. Merci pour ses nombreux conseils et sa grande disponibilité pendant toute la période de ce mémoire.

Je remercie Emeline, ma tutrice, pour ses conseils et ses encouragements durant ce mémoire. Elle m'a communiqué son grand enthousiasme pour la science et a partagé ses nombreuses connaissances. Merci pour tout !

Je remercie les autres membres de la team BEAR pour leur aide et leurs conseils. Merci de vous être rendu disponibles à chaque fois que j'avais besoin d'aide. Merci à Seb sur qui je pouvais toujours compter quand Eme n'était pas là. Merci à Lio de m'avoir montré la super technique pour enlever les joints des tubes de synchro. Merci à Françoise pour ses conseils et sa gentillesse. Et enfin, merci à Hélène sans qui ce mémoire n'aurait pas été le même. Merci pour tous ces moments passés ensemble, merci de m'avoir montré comment ne PAS préparer de l'agarose et merci pour les melons !

Je remercie également tous les mémos : Hélène, Nico, Rosa, Aurore, Manon et Hélène. Merci pour tous les moments de détente passés ensemble.

Merci aussi à toute l'URBM, pour votre bonne humeur et la super ambiance du labo, vous avez permis de rendre ce mémoire absolument inoubliable. Merci à Jérôme et Severin pour leur aide, leurs conseils et pour avoir sauvé de (très) nombreux tubes de synchro coincés dans la centri. Merci à Jean-François pour tous ses conseils pour la construction de mes souches et pour les nombreuses discussions. Merci à Arnaud pour ses blagues et sa bonne humeur. Merci à Fred et Simon pour les conversations, scientifiques ou non. Merci à Christian pour sa bonne humeur et les conseils sur le FACS. Merci à tous !

Et, bien évidemment, un grand merci à l'équipe Géo pour l'organisation de la beer-hour hebdomadaire.

Je remercie d'avance Jérôme Coppine, Régis Hallez, Boris Hespeels et Frederic Silvestre pour le temps consacré à ce mémoire.

Pour finir, je remercie ma famille, mes parents et ma sœur Aude ainsi que Jordan, pour m'avoir soutenue pendant toute la durée de mes études universitaires et de ce mémoire.

Table des matières

Introduction	08
1. Adaptation aux stress chez les bactéries :	08
2. Le Cuivre :	09
1) Début de l'utilisation du Cu par les systèmes biologiques :	09
2) Dualité du Cu :	190
3) Homéostasie du Cu :	11
4) Exemples d'adaptation bactérienne face au Cu :	13
3. <i>Caulobacter crescentus</i>	13
1) Cycle cellulaire de <i>C. crescentus</i> :	13
2) Contrôle de la division :	16
Objectifs.....	18
Résultats et Discussion :	20
1. Impact du Cu sur le cycle cellulaire de <i>C. crescentus</i> :	20
2. La concentration intracellulaire en Cu est limitante pour les transitions G1/S et G2/M :	41
1) Transition G1/S :	41
2) Transition G2/M :	23
3. Le Cu pourrait agir directement sur la cytokinèse par un système de réponse au stress :	27
4. Le Cu pourrait agir indirectement sur la cytokinèse :	28
5. Recherche d'acteurs impliqués dans l'allongement de la transition G2/M	29
Conclusions et Perspectives :	32

Matériels et Méthodes	36
1. Souches et plasmides :	36
2. Milieux :	37
3. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries :	38
1) Synchronisation des bactéries :	38
2) Détermination des courbes de croissance :	38
3) Détermination du contenu en ADN par cytométrie de flux (FACS) :	38
4) Western Blot (WB) :	39
5) Microscopie à fluorescence :	39
6) Spectrométrie d'absorption atomique (AAS) :	40
7) Mutagenèse transpositionnelle :	40
Bibliographie	42

Introduction

Introduction

1. Adaptation aux stress chez les bactéries :

Les bactéries sont des organismes unicellulaires, procaryotiques et ubiquitaires. Elles se retrouvent dans tous les biotopes tels que les sols, l'air, les océans ou les eaux douces. Certaines peuvent être pathogènes tandis que d'autres réalisent une symbiose avec leur hôte. Les bactéries peuvent également se retrouver dans des environnements peu propices à la vie, comme des milieux pollués ou même des milieux extrêmes tels que les sources chaudes et les glaciers. Cependant, afin de pouvoir survivre, les bactéries doivent être capables de s'adapter rapidement à un stress, à une modification de leur environnement.

De nombreux types de stress peuvent être rencontrés par les bactéries : une diminution de la présence de nutriments, la présence de produits toxiques (métaux lourds, antibiotiques), un stress oxydatif, ou encore, des variations de la température ou du pH. Pour survivre dans ces conditions, les bactéries doivent donc être capables de s'adapter rapidement à ces variations. Elles ont pour cela développé de multiples stratégies au fil du temps. Parmi ces stratégies, certaines nécessitent un changement du développement de la bactérie. Ce changement peut entraîner une modification de leur forme afin de les rendre plus résistantes à un stress, comme les spores ou les hétérocystes. Des bactéries peuvent également se regrouper pour former des biofilms.

Lors d'une carence en nutriments, *Bacillus* et *Clostridium* peuvent engendrer une forme de résistance : la spore. Cette forme possède une morphologie différente de celle de la bactérie. Elle lui permet de résister à des conditions qui devraient normalement la tuer. De plus, ces spores peuvent rester sous cette forme pendant de très longues périodes, en attendant que les conditions redeviennent meilleures (Errington, 2003).

Certaines cyanobactéries, comme *Anabaena*, peuvent répondre à un manque d'azote en produisant des hétérocystes. En présence d'azote, cette bactérie grandit normalement sous forme de longs filaments composés de cellules végétatives pouvant effectuer la photosynthèse. Cependant, la photosynthèse et la fixation d'azote ne peuvent s'effectuer dans la même cellule car l'O₂ inhibe l'enzyme permettant la réduction de l'azote, la nitrogénase. En absence d'une source d'azote, ces bactéries développent alors un deuxième type cellulaire appelé hétérocyste (Kumar *et al.*, 2010).

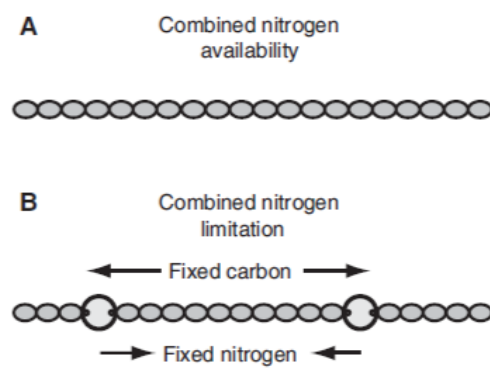


Figure 1 : Formation d'hétérocystes lors d'une carence en azote (Kumar et al., 2010).

Les hétérocystes apparaissent toutes les 10 à 20 cellules végétatives et sont facilement reconnaissables par leur taille plus importante (Fig. 1). Leur membrane externe est plus importante afin de limiter les échanges gazeux avec l'extérieur. Cela permet de créer un environnement sans O_2 où la fixation d'azote peut avoir lieu. Les deux types cellulaires sont interdépendants : les cellules végétatives ont besoin de l'azote produit dans l'hétérocyste tandis que l'hétérocyste a besoin du carbone en provenance des cellules végétatives. La modification de la structure de la bactérie lui a donc permis de répondre à un stress qui est, dans ce cas-ci, le manque d'azote (Kumar *et al.*, 2010).

D'autres bactéries, comme *Pseudomonas aeruginosa*, peuvent également se rassembler et sécréter une matrice extracellulaire polysaccharidique appelée biofilm. Beaucoup de bactéries s'organisent de cette manière dans leur habitat naturel. En effet, ce biofilm peut agir comme une barrière qui empêche ou diminue la diffusion d'agents antimicrobiens. Les bactéries à l'intérieur de ces biofilms sont moins exposées au stress et peuvent donc mieux y résister (Mah and O'Toole, 2001).

2. Le Cuivre :

La présence de métaux lourds (plomb, cuivre) dans l'environnement fait partie des stress qui peuvent être rencontrés par les bactéries.

1) Début de l'utilisation du Cu par les systèmes biologiques :

Avant l'apparition de l'oxygène atmosphérique, le Cu^+ se trouvait sous forme de sulfures insolubles et ne pouvait donc pas être utilisé par les systèmes biologiques (Solioz *et al.*, 2010). Après l'apparition de l' O_2 produit par les cyanobactéries, l'atmosphère est progressivement devenue oxydante. Cela a permis l'oxydation du Cu^+ insoluble en Cu^{2+} soluble, le rendant alors disponible pour les processus biologiques.

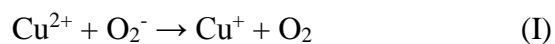
De plus, ce métal peut facilement passer de la forme oxydée, Cu^{2+} (état cuivrique) à la forme réduite Cu^+ (état cuivreux). Il est à noter que le Cu sous forme Cu^{3+} ou Cu^{4+} peut également exister mais de manière beaucoup plus rare (Rensing and Grass, 2003). La croûte terrestre comporte environ 10^{15} tonnes de Cu (Trevors and Cotter, 1990).

2) Dualité du Cu :

Le cuivre intervient dans de nombreux processus cellulaires, tels que les phosphorylations oxydatives (Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2013). Il sert également de cofacteur à de nombreuses enzymes (superoxyde dismutase, amine oxydase). Les enzymes utilisant le Cu sont généralement des enzymes périplasmiques ou membranaires (membrane interne) (Rensing and Grass, 2003). Le Cu est généralement lié aux protéines via des cystéines, des méthionines ou des histidines (Osman and Cavet, 2008).

Le cuivre est donc absolument indispensable à la vie lorsqu'il est présent en faible quantité. Cependant, si la concentration de cuivre augmente, il devient alors dangereux pour la cellule et même toxique. Il peut ainsi générer un stress oxydatif par des réactions semblables à la réaction de Fenton produisant des radicaux libres (ROS) toxiques pour divers substrats cellulaires tels que l'ADN (Kimura and Nishioka, 1997). Cependant, il est à noter que la capacité du Cu à créer des dommages à l'ADN *in vivo* est assez controversée. Le Cu a également la capacité de déplacer des ions métalliques natifs (Macomber and Imlay, 2008) ou encore de créer des ponts disulfures dans le périplasma (Osman and Cavet, 2008). Il peut donc déstabiliser un grand nombre de protéines, empêchant ainsi leur fonction.

Le Cu^+ est plus toxique que le Cu^{2+} car il peut diffuser à travers la membrane plasmique et générer des dommages dans le cytoplasme (Rensing and Grass, 2003). Après sa liaison avec le Cu^{2+} , la superoxyde dismutase peut détoxifier l'anion superoxyde (I) mais cette réaction mène à la formation de Cu^+ , toxique, qui peut générer des réactions semblables à la réaction de Fenton (II) :



La cellule a donc un besoin vital de réguler de manière très fine l'homéostasie du Cu afin de permettre l'accomplissement correct des différents processus biologiques tout en empêchant sa toxicité. Elle doit de plus être capable de distinguer le Cu des autres métaux (Osman and Cavet, 2008).

Il est également à noter que, chez l'Homme, des troubles de l'homéostasie du Cu peuvent entraîner certaines maladies comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (Rensing and Grass, 2003). Par exemple, la maladie de Wilson est une maladie génétique liée à un problème d'accumulation du Cu. La protéine ATPB7, homologue de CopA, est défectueuse et ne peut plus exporter le Cu hors des cellules (Macomber and Imlay, 2009).

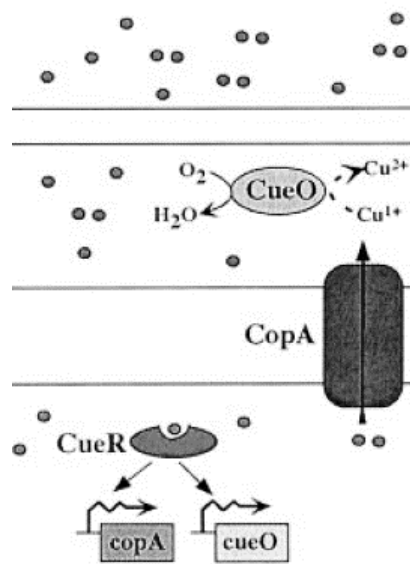


Figure 2 : Représentation schématique du système Cue (Outten et al., 2001).

3) Homéostasie du Cu :

L'entrée du cuivre dans les bactéries est peu documentée. La principale hypothèse est que le Cu passe au niveau des porines (Rensing and Grass, 2003). Différents moyens sont mis en place par les bactéries pour éviter une trop grande augmentation de la concentration intracellulaire en Cu. Les moyens les plus courants sont la transformation du Cu en une forme moins toxique ou l'export du Cu hors de la bactérie (Trevors and Cotter, 1990). Une séquestration extra- ou intra-cellulaire du Cu peut également avoir lieu.

Une partie du Cu présent dans le milieu peut être séquestré de manière extracellulaire. En effet, les bactéries peuvent produire des exo-polysaccharides particuliers au niveau de leur membrane externe qui retiennent le Cu par interactions électrostatiques. Le Cu ainsi bloqué ne peut pas pénétrer dans la cellule. Cependant, il s'agit d'un mécanisme passif et non-spécifique (Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2013).

Le Cu intracellulaire est toujours lié à des protéines, des chaperonnes ou des chélateurs. Il ne reste pas sous forme libre qui est toxique pour la cellule (Rensing and Grass, 2003). Les chaperonnes du Cu permettent de diriger le Cu vers ses différentes destinations. Elles interagissent spécifiquement avec certaines protéines qui peuvent alors se servir de ce Cu comme cofacteur. Par exemple, chez *Bacillus*, la chaperonne CopZ interagit avec la multi-copper oxydase CopA (Osman and Cavet, 2008).

Certains métabolites intracellulaires, comme le glutathion, peuvent chélater le Cu et ainsi l'empêcher de causer des dommages (Macomber and Imlay, 2009).

Trois systèmes de détoxification du Cu ont été décrits chez *Escherichia coli* : les systèmes Cue, Cus et Pco.

a) Le système Cue :

Le système Cue (Cu efflux) est le premier système utilisé pour faire face à une augmentation de la concentration intracellulaire en Cu. Il est induit lors de stress modérés ou élevés. CueR est le senseur qui est activé par la présence de Cu^+ libre et permet la production de CopA, une $\text{P}_{1\text{B}}$ -type ATPase, ainsi que de CueO, une multi-copper oxydase (Fig. 2) (Outten *et al.*, 2001).

Les $\text{P}_{1\text{B}}$ -type ATPases sont des protéines membranaires qui peuvent transporter un métal (Cu, Zn, Cd) en utilisant l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP. Elles possèdent une grande spécificité pour le métal transporté. CopA permet donc d'exporter le Cu^+ du cytoplasme et de le stocker dans le périplasme (Osman and Cavet, 2008).

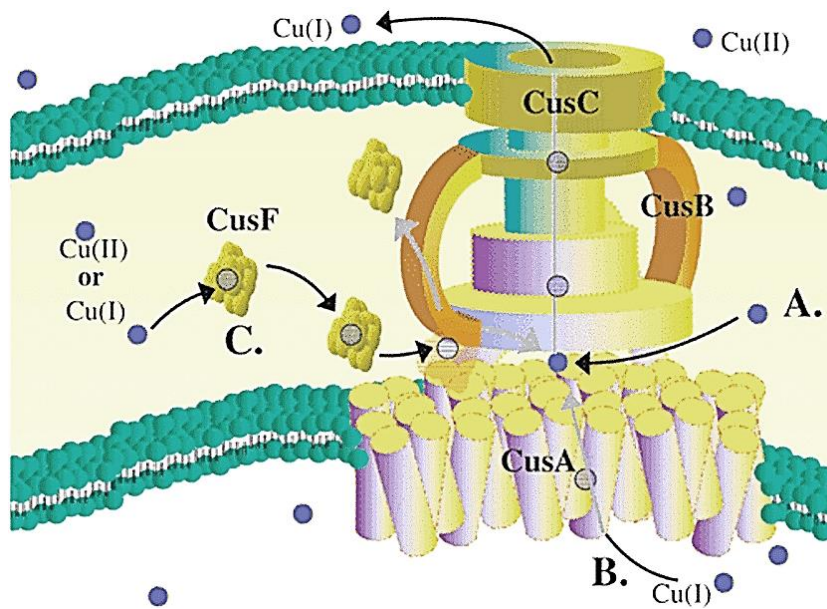


Figure 3 : Représentation schématique du système Cus. Le Cu peut entrer dans le complexe via le périplasm (A.), le cytoplasme (B.) ou la chaperonne CusF (C.) (Rensing and Grass, 2003).

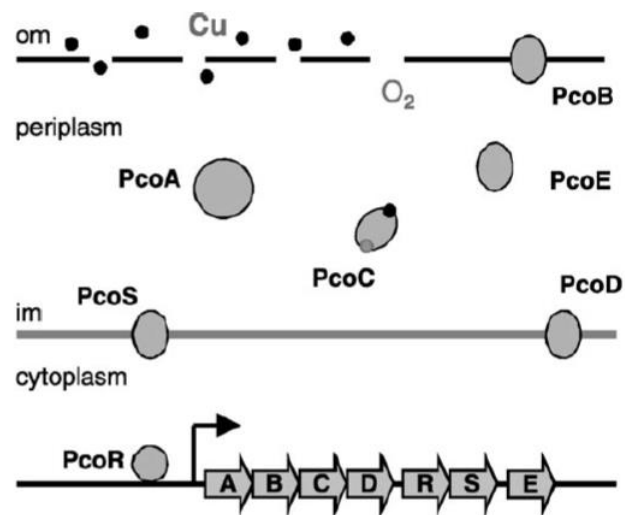


Figure 4: Représentation schématique du système Pco (Djoko et al., 2008).

Les multi-copper oxydases peuvent oxyder un grand nombre de substrats. CueO permet de convertir le Cu^+ en Cu^{2+} moins toxique au niveau du périplasma et transfère l'électron ainsi libéré à l' O_2 pour le réduire en H_2O_2 (Singh *et al.*, 2004). Son activité dépend donc de l' O_2 . Il est à noter que CueO permet de protéger les enzymes périplasmiques, comme la phosphatase alcaline, contre les dommages liés au Cu, en régulant le taux de Cu dans le périplasma. En effet, le Cu peut entraîner un mauvais repliement de ces protéines (Grass and Rensing, 2001). En présence de Cu, CueO peut aussi oxyder l'entérobactine qui réduit le Cu^{2+} en Cu^+ toxique (Osman and Cavet, 2008).

b) Le système Cus :

Le système Cus (Cu sensing) intervient en cas de stress extrême, quand le système Cue seul ne suffit plus (Outten *et al.*, 2001). Le système à deux composants CusR/S permet d'activer l'opéron *cusCBAF* en présence de Cu^+ dans le périplasma. CusCBA forme un complexe permettant d'exporter le Cu du cytoplasme ou du périplasma vers le milieu extracellulaire (Fig. 3). CusA appartient à la famille des protéines RND. Elle permet l'export d'ions métalliques en l'associant avec le transport de protons. CusB et CusC sont ancrées respectivement dans la membrane cytoplasmique et dans la membrane externe (Rensing and Grass, 2003). CusF est une chaperonne périplasmique qui lie le Cu^+ et peut interagir avec CusC et CusB (Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2013).

c) Le système Pco :

Le système Pco (plasmid-borne copper resistance) identifié chez *E. coli* est encodé par l'opéron plasmidique *pcoABCDRE* (Lee *et al.*, 2002). Son mécanisme est assez peu connu. PcoR et PcoS font partie d'un régulateur à deux composants qui permet d'induire les autres gènes *pco*. PcoA est une multi-copper oxydase, prédite pour être l'homologue de CueO. Elle possède 4 sites de liaison pour le Cu^{2+} et utilise la voie TAT pour transloquer vers le périplasma. La voie TAT permet le passage de protéines foldées à travers la membrane interne, contrairement à la voie Sec qui nécessite que la protéine soit dépliée. Une fois dans le périplasma, PcoA peut alors exercer sa fonction oxydase pour oxyder le Cu^{2+} en Cu^+ , moins toxique pour la cellule (Fig. 4) (Osman and Cavet, 2008).

PcoB est prédite pour être une protéine de la membrane externe dont la fonction est peu connue. Il pourrait s'agir d'une ancre pour PcoA ou, probablement, d'un canal permettant la sortie du Cu hors de la cellule (Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2013).

PcoC est prédite pour être une protéine périplasmique qui lierait le Cu^+ et le présenterait à PcoA pour l'oxyder. PcoE est la seule protéine Pco à être contrôlée par CusR/S. Elle pourrait donc permettre de séquestrer le Cu périplasmique avant l'induction totale du système Pco (Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2013). PcoD permet le transport de Cu à travers la membrane cytoplasmique (Djoko *et al.*, 2008).

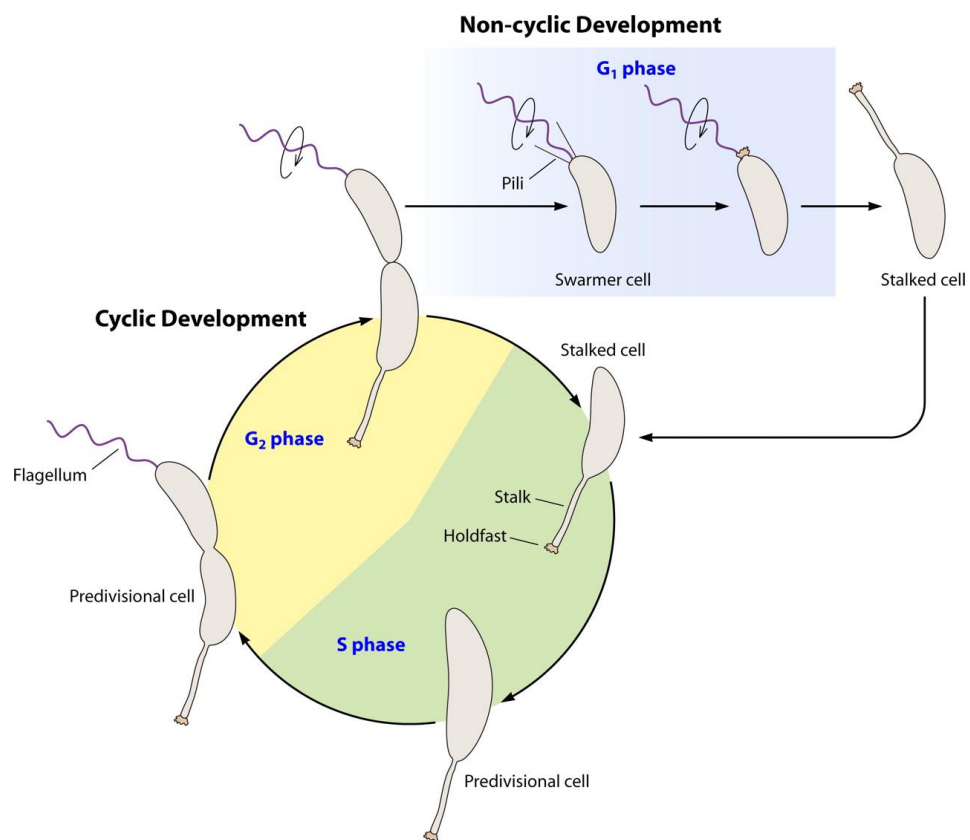


Figure 5 : Cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus* (Curtis and Brun, 2010).

4) Exemples d'adaptation bactérienne face au Cu :

Les effets du Cu ont déjà été montrés chez certaines bactéries.

En condition de stress, *Bacillus subtilis* forme une endospore par division asymétrique qui lui permet de survivre. Lorsque la concentration en Cu est faible, il n'y a pas de formation de spores et *B. subtilis* grandit normalement. Cependant, si la concentration en Cu augmente, il y a sporulation (Kojetin *et al.*, 2005).

D'autres bactéries comme *Klebsiella aerogenes* secrètent une capsule d'exopolysaccharides qui leur confèrent une meilleure résistance au Cu (Trevors and Cotter, 1990).

Cette étude se concentre sur l'impact du Cu sur le cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*.

3. *Caulobacter crescentus*

Dans cette étude, l'impact du Cu sera étudié sur la bactérie aquatique *Caulobacter crescentus*. Il s'agit d'une bactérie à gram négatif appartenant au phylum des alpha-protéobactéries, tout comme *Brucella*. Elle vit dans des milieux aquatiques oligotrophes et pollués. *C. crescentus* est utilisée depuis de nombreuses années comme modèle de différenciation et du cycle cellulaire. Son cycle cellulaire est dit dimorphique car il génère 2 types de cellules : la cellule flagellée et la cellule pédonculée.

1) Cycle cellulaire de *C. crescentus* :

La cellule flagellée, limitée au stade G1, possède un flagelle et est donc capable de se déplacer dans le milieu (Fig. 5). Dans un processus de différenciation en cellule pédonculée, la cellule flagellée perd son flagelle et acquiert un pédoncule qui lui permet de se fixer à son substrat en sécrétant un polysaccharide à forte capacité adhésive. Cette forme est donc sessile mais devient compétente pour la réplication d'ADN. Elle passe alors en phase S et réplique son unique chromosome. La cellule s'allonge et devient une cellule pré-divisionnelle, correspondant au stade G2. Cette cellule se divise alors par division asymétrique générant à nouveau une cellule pédonculée et une cellule flagellée. Alors que la cellule pédonculée peut directement réinitier la réplication du chromosome, la cellule flagellée peut nager vers un endroit optimal à sa survie avant d'accomplir son processus de différenciation (Curtis and Brun, 2010). De par leur différence de densité, il est aisé de synchroniser une population bactérienne en isolant les cellules flagellées par centrifugation en gradient de silicates et de suivre leur progression dans le cycle cellulaire après remise en culture.

Dans le reste de cette étude, la différenciation des cellules flagellées en cellules pédonculées sera appelée transition G1/S et, la division des cellules pré-divisionnelles, transition G2/M.

Le cycle cellulaire de *C. crescentus* s'effectue en plusieurs grandes étapes : l'initiation de la réplication, la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse.

a) Initiation de la réplication :

L'initiation de la réplication chez *C. crescentus* ne s'effectue qu'une seule fois à chaque cycle cellulaire. L'origine de réplication est nommée *Cori* (Curtis and Brun, 2010). Le principal régulateur de la division chez *C. crescentus* est la protéine CtrA qui permet de réguler un très grand nombre de gènes. En effet, CtrA peut réguler un quart des 553 gènes régulés au cours du cycle cellulaire. CtrA est elle-même régulée de manière transcriptionnelle et post-traductionnelle (phosphorylation, déphosphorylation et dégradation) (Laub *et al.*, 2002).

Dans les cellules flagellées, la forte présence de CtrA phosphorylée inhibe la réplication de l'ADN en se liant près de la région *Cori*. Après la différenciation en cellules pédonculées, CtrA est déphosphorylée et dégradée, permettant ainsi l'initiation de la réplication. De plus, lors de la séparation des 2 cellules-filles, CtrA sera phosphorylée spécifiquement dans la cellule flagellée (Laub *et al.*, 2002).

b) Ségrégation des chromosomes :

La ségrégation des chromosomes est régulée par le système ParABS. *parS* est localisé près de *Cori* et agit comme le centromère des cellules eucaryotes. ParB se lie au niveau de *parS* permettant ainsi à ParA de se lier à ce complexe. Cela entraîne la dépolymérisation des filaments de ParA et permet alors la migration de ParB-*parS* à travers la cellule (Curtis and Brun, 2010).

c) Cytokinèse :

La cytokinèse peut être séparée en 3 principales étapes : l'assemblage de l'anneau Z au centre de la cellule, le recrutement des protéines de division et la synthèse du peptidoglycan (Lutkenhaus *et al.*, 2012).

- Assemblage de l'anneau Z :

La première étape de la division est la formation de l'anneau Z au centre de la cellule. Cet anneau est constitué de la protéine FtsZ qui s'assemble sous forme de filaments. FtsZ est un homologue de la tubuline des cellules eucaryotes. Il est à noter que chez *C. crescentus*, la formation de l'anneau Z ne se déroule pas exactement au centre de la cellule, générant une cellule-fille pédonculée légèrement plus grande que la cellule-fille flagellée (Curtis and Brun, 2010).

Il existe deux principaux systèmes permettant la localisation de FtsZ au centre de la cellule : le système Min et l'occlusion du nucléoïde. Cependant, *C. crescentus* n'utilise aucun de ces deux systèmes mais un système semblable au système Min. Il implique la protéine MipZ qui disrute les filaments de FtsZ (Curtis and Brun, 2010). Les monomères de MipZ sont recrutés par ParB, aux pôles de la cellule. ParB est lié près de l'origine de réplication *Cori*. ParB entraîne la dimérisation de MipZ qui diffuse alors dans la cellule. Il se crée ainsi un gradient de MipZ : il est plus élevé au niveau des pôles et moins élevé au milieu de la cellule. Cela permet donc d'empêcher la formation de filaments de FtsZ aux pôles et de promouvoir leur formation au centre de la cellule, là où doit se former l'anneau de division (Lutkenhaus *et al.*, 2012).

- Formation du divisome :

Une fois que l'anneau de FtsZ est formé, les autres protéines du divisome sont recrutées afin de terminer la division et la séparation des deux cellules filles. Il y a neuf protéines de division essentielles : FtsA, FtsE, FtsX, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsI, FtsW et FtsN. FtsA permet l'ancrage en membrane de FtsZ.

FtsE et FtsX sont des transporteurs ABC. Ils sont homologues au système Lol qui extrait les lipoprotéines hors de la membrane cytoplasmique. FtsX constitue le composant membranaire et FtsE est l'ATPase (Lutkenhaus *et al.*, 2012). FtsE et FtsX pourrait également participer à l'ancrage de FtsZ en membrane (Goley *et al.*, 2011). FtsK est une translocase ADN. Elle permet de transloquer l'ADN éventuellement bloqué au niveau du septum. Cependant, son rôle majeur est de permettre la fusion des membranes afin de compléter la cytokinèse (Lutkenhaus *et al.*, 2012).

FtsQ et FtsL forme un complexe important pour maintenir la stabilité du divisome. FtsN est une des dernières protéines de division à arriver au niveau du divisome et permet également de maintenir sa stabilité (Goley *et al.*, 2011). De plus, FtsN permet le recrutement de plusieurs protéines impliquées dans la synthèse du peptidoglycan (Strobel *et al.*, 2014). FtsI et FtsW font partie de la machinerie de remodelage du peptidoglycan pour la septation. (Lutkenhaus *et al.*, 2012). FtsI est requis pour la biosynthèse du peptidoglycan (Wang *et al.*, 1998).

- Synthèse du peptidoglycan :

Une fois le divisome assemblé, la protéine FtsI est activée et permet la synthèse du peptidoglycan, entraînant ainsi la septation de la cellule. D'autres protéines sont également recrutées afin de permettre le remodelage du peptidoglycan et l'invagination de la membrane externe afin de permettre la séparation des deux cellules-filles (Lutkenhaus *et al.*, 2012).

2) Contrôle de la division :

Le contrôle de la division est un processus très important chez tous les organismes. Lorsque les conditions sont favorables, les bactéries peuvent se diviser et proliférer. En revanche, en conditions de stress, elles doivent être capables de stopper leur division et d'utiliser l'énergie ainsi économisée pour survivre.

Par exemple, lors d'un choc thermique, l'accumulation de protéine mal foldées entraîne l'activation d'une protéase, Lon, qui dégrade DnaA, le facteur d'initiation de la réplication. Ainsi, les cellules ne pouvant initier leur réplication restent bloquées en G1 et ne se divisent pas (Jonas *et al.*, 2013).

Lors d'une diminution de la concentration en carbone dans le milieu, les cellules flagellées de *C. crescentus* sont capables d'inhiber l'initiation de la réplication de l'ADN et restent ainsi bloquées en phase G1 (Britos *et al.*, 2011).

Comme dit précédemment, le Cu pourrait induire un stress oxydatif et ainsi entraîner des dommages à l'ADN. En cas de dommages à l'ADN, *C. crescentus* doit également être capable d'inhiber sa division. En effet, effectuer la réplication d'un ADN endommagé étendrait ces erreurs aux générations suivantes. Les conséquences peuvent être graves et mener à la mort des cellules-filles. Le mécanisme permettant alors de stopper la division est appelé réponse SOS.

Les gènes *sos* sont organisés en opéron. Leur transcription est réprimée par l'inhibiteur LexA. Lors de dommages à l'ADN, les cassures de l'ADN sont reconnues par la protéine RecA. RecA permet alors le clivage de LexA, rendant possible la transcription des gènes *sos*. Ces gènes permettent alors la réparation des dommages à l'ADN. Cependant, afin d'empêcher la division avant la réparation des dommages à l'ADN, un des gènes *sos* est un inhibiteur de la division (Modell *et al.*, 2014).

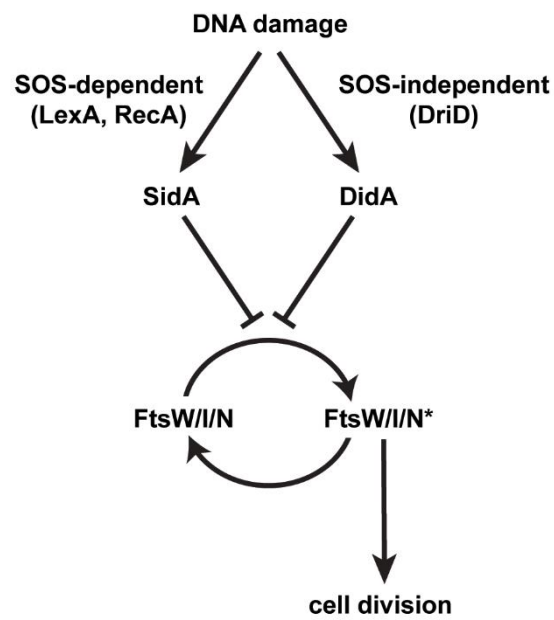


Figure 6 : Mécanisme de contrôle de la division par SidA et DidA (Modell et al., 2014).

Chez *E. coli*, la réponse SOS permet l'induction de l'inhibiteur Sula. Cette protéine inhibe la division en séquestrant les monomères de FtsZ, les empêchant ainsi de former des filaments. Cependant, Sula n'est pas conservé chez *C. crescentus*. Cette bactérie possède un autre inhibiteur dépendant de la réponse SOS : SidA (SOS-induced inhibitor of cell division A), une protéine de la membrane interne. SidA inhibe la division en interagissant avec la protéine de division FtsW (Fig. 6) (Modell *et al.*, 2014).

Cependant, des souches délétantes pour SidA sont tout de même capables d'inhiber leur division en cas de dommages à l'ADN, indiquant qu'un autre mécanisme doit également exister. Cet autre inhibiteur de la division est également induit par des dommages à l'ADN mais est indépendant de la réponse SOS. Il s'agit de la protéine DidA, activée par le facteur de transcription DriD. DidA inhibe la division en interagissant avec la protéine de division FtsN (Fig. 6). Ensemble, SidA et DidA ont une fonction redondante (Modell *et al.*, 2014).

Objectifs

L'impact du Cu a précédemment été étudié dans le laboratoire dans le cadre de la thèse d'Emeline Lawarée. Il y a été montré que le Cu entraînait un allongement du temps de division de *C. crescentus* sans pour autant entraîner une augmentation du taux de mortalité.

La concentration de Cu utilisée dans toutes les expériences est de 1,16 mM. Cette concentration a été choisie car il s'agit d'une concentration ayant un impact modéré sur la croissance de *C. crescentus*. Plus précisément, un traitement de 1,16 mM Cu sur les bactéries entraîne un allongement de la transition G1/S ainsi que de la transition G2/M.

Pour réaliser les différentes expériences, le Cu a été utilisé sous forme de CuSO_4 . Cependant, afin de vérifier que l'effet observé soit bien dû au Cu et non pas au SO_4 , d'autres sources comme le $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ et le CuCl_2 ont été utilisées. L'effet observé reste le même, indiquant bien qu'il est lié au Cu.

Cette étude a pour but de mieux comprendre l'allongement de la transition G2/M. La compréhension du ou des mécanisme(s) permettra de mieux comprendre la réponse au Cu de *C. crescentus*.

Résultats et Discussion

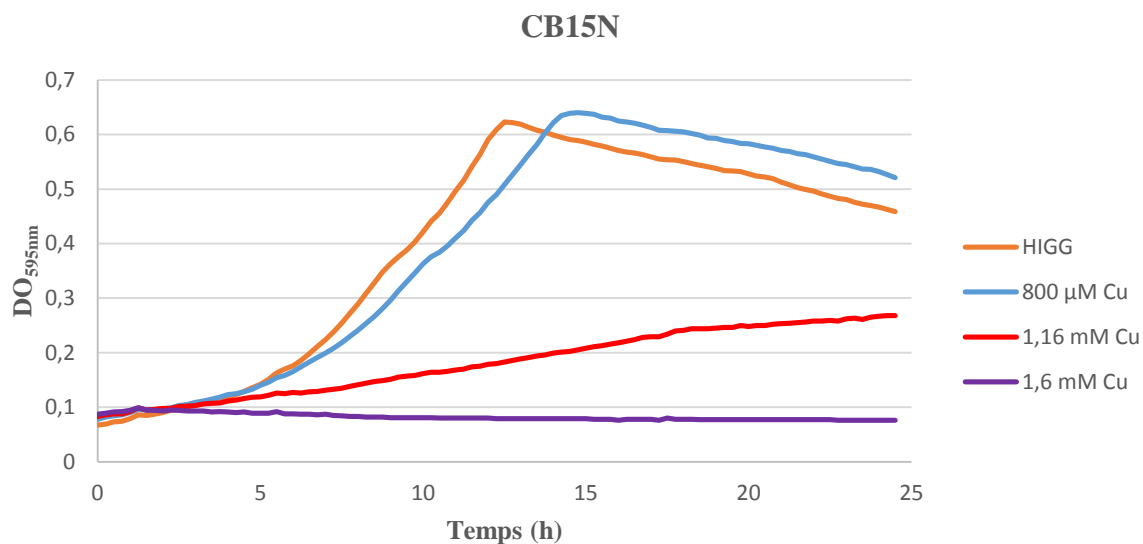


Figure 7 : Courbes de croissance de la souche CB15N en condition contrôle et traitée avec 800 µM ; 1,16 mM et 1,6 mM de Cu.

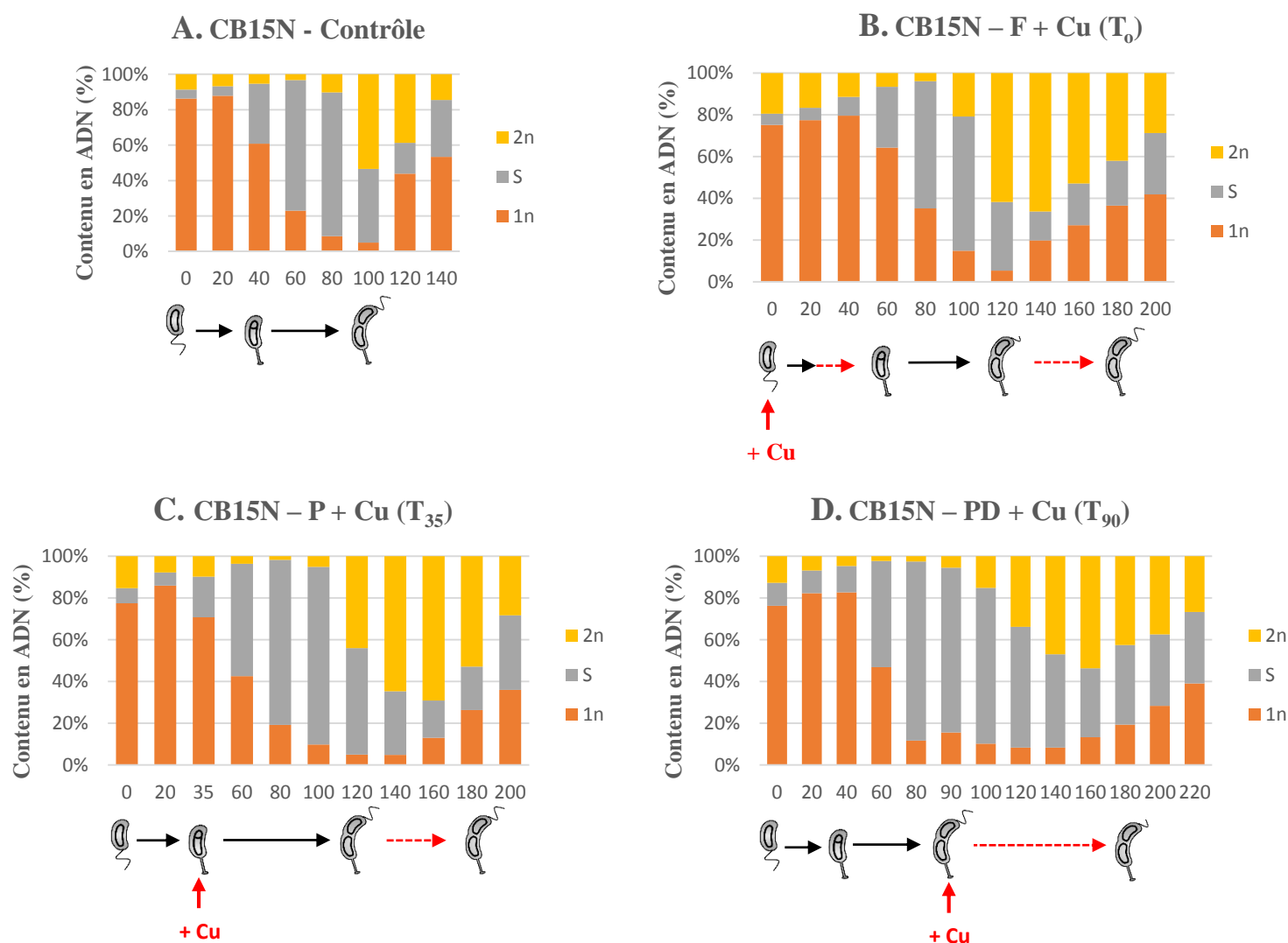


Figure 8 : Détermination du contenu en ADN chez la souche CB15N par FACS. (A.) Condition contrôle. (B.) Ajout du Cu sur les cellules flagellées, directement après la synchronisation. (C.) Ajout du Cu sur les cellules pédonculées, 35 min après la synchronisation. (D.) Ajout du Cu sur les cellules pré-divisionnelles, 90 min après la synchronisation.

Résultats et Discussion

1. Impact du Cu sur le cycle cellulaire de *C. crescentus* :

La souche CB15N sauvage de *C. crescentus* a tout d'abord été mise en culture dans du milieu pauvre et contrôlé HIGG avec différentes concentrations de Cu et des courbes de croissance ont été réalisées (Fig. 7). La concentration de 1,16 mM montre un impact modéré sur la croissance. Cette concentration sera utilisée dans le reste de cette étude.

Afin de confirmer l'allongement des transitions G1/S (différenciation des cellules flagellées en cellules pédonculées) et G2/M (division des cellules pré-divisionnelles) suite à un traitement au Cu, nous avons tout d'abord procédé à une synchronisation d'une culture de cellules CB15N. La synchronisation permet de séparer les cellules flagellées des autres types cellulaires (pédonculés et pré-divisionnels) grâce à leur différence de densité. Les cellules flagellées (F) (directement après la synchronisation), les cellules pédonculées (P) (35 min après la synchronisation) et les cellules pré-divisionnelles (PD) (90 min après la synchronisation) ont ensuite été cultivées dans un milieu de culture contenant du Cu. Des échantillons ont ensuite été collectés toutes les 20 min jusqu'à ce que les cellules se divisent. Le contenu en ADN des bactéries a alors pu être déterminé par cytométrie de flux (FACS). Les cellules flagellées (phase G1) ont seulement un chromosome et sont indiquées comme 1n alors que les cellules pré-divisionnelles (phase G2) ont deux chromosomes (car la réplication a eu lieu mais pas la division) et sont indiquées comme 2n. Les cellules pédonculées (phase S) sont en train de répliquer leur ADN et sont donc indiquées comme S.

En absence d'exposition au Cu (Fig. 8A.), la transition G1/S se produit 40 min après la synchronisation. La phase G2 débute après 100 min et la transition G2/M se produit après 120 min. Lorsque le Cu est ajouté sur les cellules flagellées (Fig. 8B.), la transition G1/S est retardée de 20 min. La phase S ne semble pas être affectée par le traitement au Cu. La phase G2 débute après 120 min et la transition G2/M survient après 200 min. Le même retard est observé si le Cu est ajouté sur les cellules pédonculées (35 min après la synchronisation) (Fig. 8C.) ou sur les cellules pré-divisionnelles (90 min après la synchronisation) (Fig. 8D.).

Ces données montrent que le retard de la division en présence de Cu est dû à un allongement des transitions G1/S et G2/M.

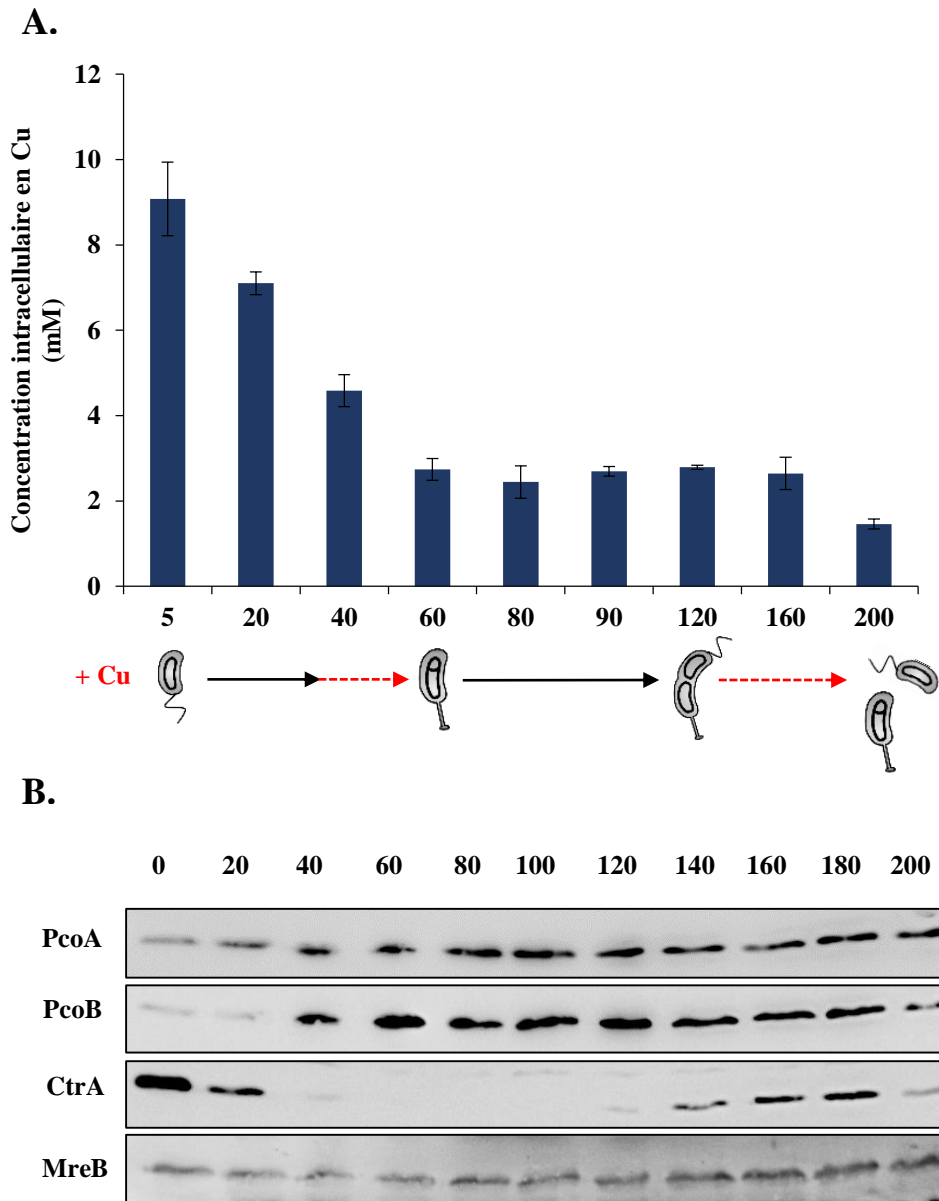


Figure 9 : **A.** Mesure de la concentration intracellulaire en Cu dans la souche CB15N par AAS. Les cellules flagellées ont été traitées avec du Cu et des cellules ont été collectées à différents moments du cycle cellulaire (5, 20, 40, 60, 80, 90, 120, 160 et 200 min). **B.** Détermination de l'expression de PcoA et PcoB au cours du cycle cellulaire par WB. Les cellules flagellées de la souche CB15N ont été traitées avec du Cu. CtrA est utilisé comme contrôle de synchronisation et MreB, comme contrôle de charge.

2. La concentration intracellulaire en Cu est limitante pour les transitions G1/S et G2/M :

Afin de déterminer si l'allongement des transitions G1/S et G2/M est dû à une augmentation de la concentration intracellulaire en Cu, la souche CB15N a été synchronisée et les cellules flagellées isolées ont été cultivées dans du milieu de culture frais contenant du Cu. Les bactéries ont ensuite été collectées à différents moments du cycle cellulaire et ont été lysées afin de mesurer leur concentration intracellulaire en Cu par spectrométrie d'absorption atomique (AAS).

Cette expérience indique que le Cu entre très rapidement dans les cellules flagellées : en effet, la concentration intracellulaire en Cu augmente fortement en seulement quelques minutes (Fig. 9A.). Par ailleurs, nous observons également que la concentration intracellulaire en Cu diminue progressivement pendant 60 min, correspondant à la transition G1/S, avant de se stabiliser (Fig. 9A.). Ces données suggèrent donc que la cellule flagellée doit d'abord diminuer sa concentration intracellulaire en Cu jusqu'à un certain seuil avant de pouvoir se différencier et initier la réplication de son ADN, ce qui peut expliquer le retard de la transition G1/S. Il n'y a pas de différence de concentration intracellulaire en Cu entre les cellules pédonculées (T₆₀) et les cellules pré-divisionnelles (T₁₂₀). Cette dernière donnée pourrait peut-être expliquer pourquoi la phase S n'est pas affectée par un traitement au Cu. De manière intéressante, les données d'AAS montrent une deuxième diminution de la concentration intracellulaire en Cu après 160 min, juste avant la transition G2/M (Fig. 9A.). Cela suggère donc que la concentration intracellulaire en Cu tolérée pour permettre la transition G1/S est toujours trop élevée pour permettre la transition G2/M. Les cellules ont donc besoin de diminuer davantage leur concentration intracellulaire en Cu avant de se diviser.

Collectivement, ces résultats indiquent que les bactéries ayant subi un traitement au Cu doivent diminuer leur concentration intracellulaire en Cu en deux étapes. Une première fois, au moment de la transition G1/S afin de permettre la réplication de l'ADN et, une deuxième fois, avant la transition G2/M afin de permettre la division. Ces diminutions de la concentration intracellulaire en Cu peuvent expliquer l'allongement des transitions G1/S et G2/M.

1) Transition G1/S :

Afin de confirmer que la cellule doit diminuer sa concentration intracellulaire en Cu afin de permettre la transition G1/S, le mécanisme responsable de cette diminution a été recherché. Une analyse *in silico* entre *E. coli* et *C. crescentus* a révélé que de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie du Cu chez *E. coli* étaient conservés chez *C. crescentus*. Parmi ces gènes, certains étaient prédits pour être régulés au cours du cycle cellulaire, comme *pcoA* et *pcoB*. Dans le cadre de la thèse de Sébastien Gillet, il a été montré que PcoA est une multi-copper oxydase périplasmique. Il a également été montré que PcoB se localise dans la membrane externe mais son rôle prédit de pompe à efflux n'a pas encore été démontré. Il s'agit des seuls membres du système Pco conservés chez *C. crescentus*. *pcoA* et *pcoB* sont organisés en opéron.

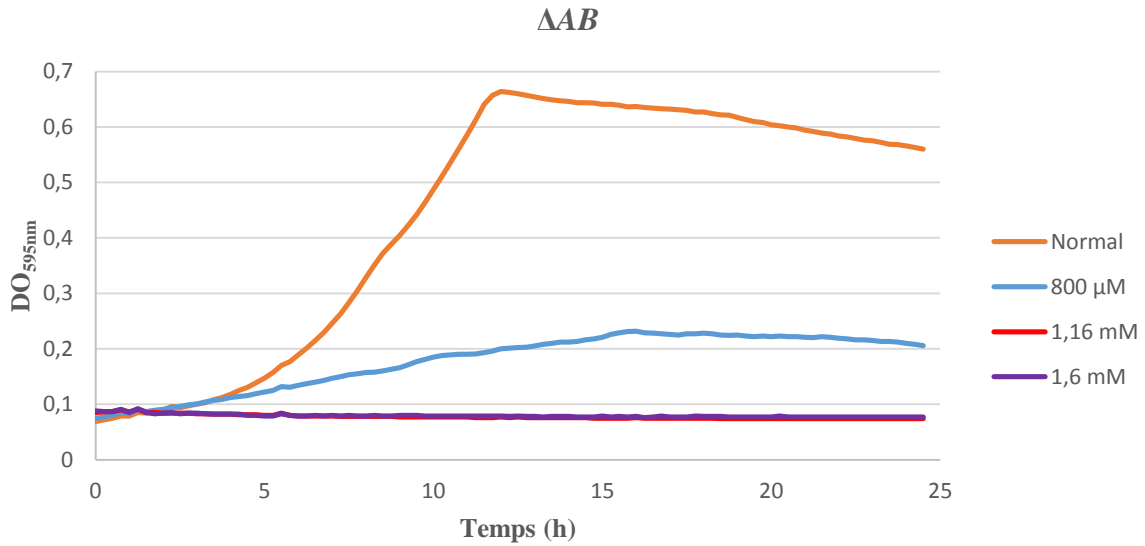


Figure 10 : Courbes de croissance de la souche ΔAB en condition contrôle et traitée avec 800 μ M ; 1,16 mM et 1,6 mM de Cu.

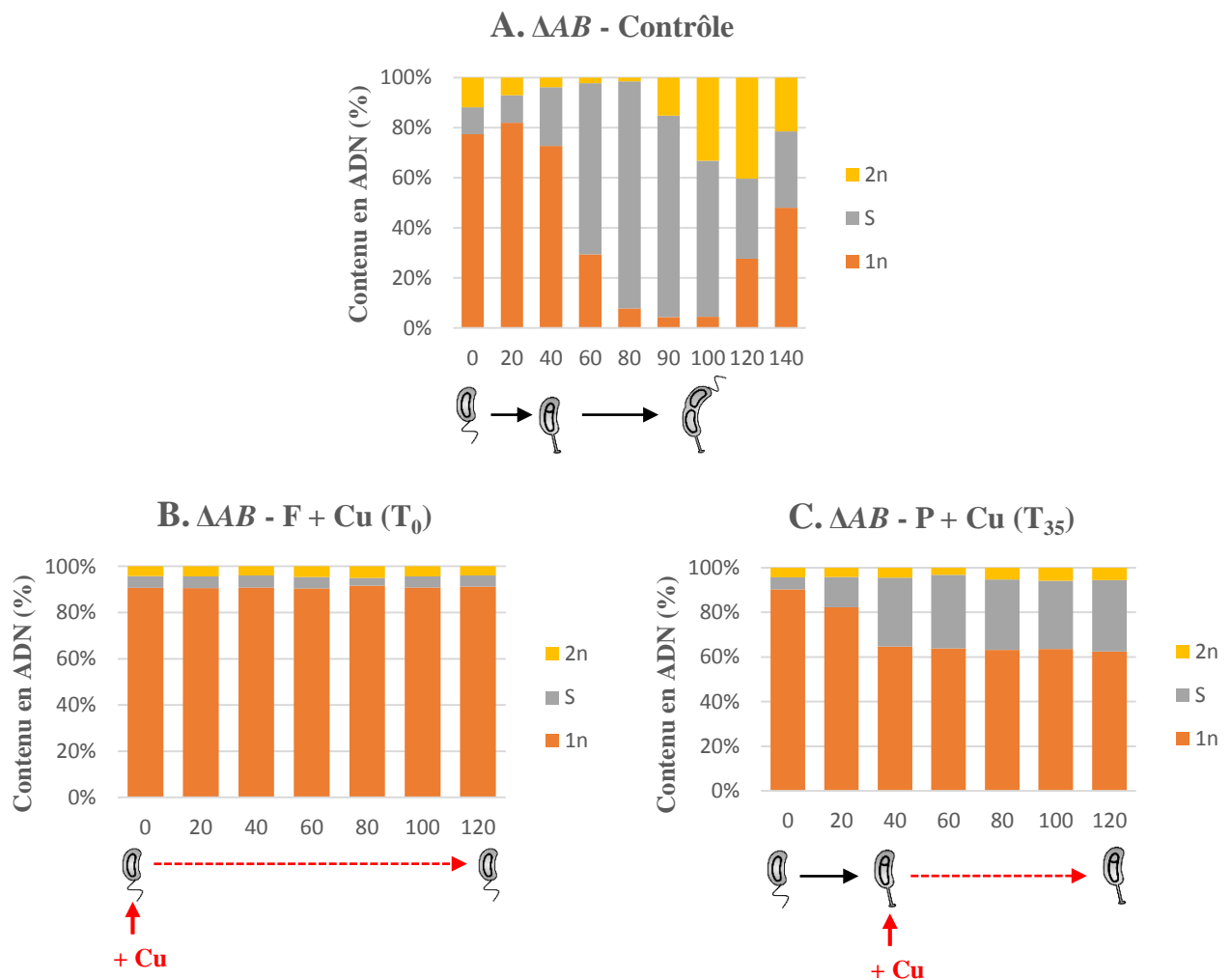


Figure 11 : Détermination du contenu en ADN chez la souche ΔAB par FACS. (A.) Condition contrôle. (B.) Ajout du Cu sur les cellules flagellées, directement après la synchronisation. (C.) Ajout du Cu sur les cellules pédonculées, 35 min après la synchronisation.

L'expression de PcoA et PcoB au cours du cycle cellulaire a été déterminée par *western blot* (WB). Pour cela, la souche CB15N a été synchronisée et les cellules flagellées ont été mises en culture dans un milieu frais contenant du Cu. Les bactéries ont ensuite été collectées toutes les 20 min jusqu'à leur division pour être analysées par WB. Ces données ont montré que PcoA et PcoB étaient faiblement exprimés dans les cellules flagellées mais que leur expression augmentait dans les cellules pédonculées pour atteindre leur expression maximale après 40 min, au moment de la transition G1/S (Fig. 9B.). La concentration intracellulaire en Cu est donc plus élevée dans les cellules flagellées, qui expriment faiblement PcoA et PcoB. Au moment de la transition G1/S, la diminution de la concentration intracellulaire en Cu correspond à l'augmentation de l'expression de PcoA et PcoB. Ces données semblent donc suggérer que PcoA et PcoB sont responsables de la première diminution de la concentration intracellulaire en Cu, au moment de la transition G1/S.

Afin de confirmer que PcoA et PcoB sont bien responsables de la première diminution de la concentration intracellulaire en Cu, la souche ΔAB , délétante pour PcoA et PcoB, a été utilisée. Ce mutant présente une sensibilité accrue au Cu (Fig. 10). Afin de déterminer le contenu en ADN au cours du cycle cellulaire, la souche ΔAB a été synchronisée et les cellules flagellées isolées ont été mises en culture dans du milieu frais contenant du Cu. Des échantillons ont été collectés toutes les 20 min et analysés par FACS. En absence de Cu (Fig. 11A.), les cellules se divisent comme la souche CB15N : la transition G1/S a lieu après 40 min, la phase G2 débute après 100 min et la transition G2/M survient après 120 min. En revanche, lorsque les cellules flagellées sont traitées avec du Cu, ces dernières restent bloquées en phase G1 et sont incapables de se différencier en cellules pédonculées (Fig. 11B.). Ces données montrent que les cellules flagellées ΔAB traitées au Cu restent bloquées en phase G1 et sont ainsi incapables de poursuivre leur cycle cellulaire.

Ensuite, afin de mesurer la concentration intracellulaire en Cu dans ce mutant, nous avons à nouveau réalisé une synchronisation de la souche ΔAB . Les cellules flagellées ont été cultivées dans un milieu contenant du Cu et les bactéries ont été collectées à différents moments du cycle cellulaire avant d'être lysées pour mesurer leur concentration intracellulaire en Cu par AAS. Ces données ont montré que la concentration intracellulaire en Cu chez la ΔAB est plus élevée que chez la souche CB15N (Fig. 12). De plus, cette concentration intracellulaire en Cu ne diminue pas au cours du temps, comme c'est le cas pour la souche CB15N. Ces données pourraient expliquer pourquoi les bactéries ΔAB ne se divisent pas lors d'un traitement au Cu.

La concentration intracellulaire en Cu a également été mesurée chez la souche $\Delta ABpAB$, dans laquelle PcoA et PcoB sont exprimés de manière ectopique. Les données AAS montrent que cette souche est capable de restaurer le phénotype de la souche CB15N. Nous pouvons d'ailleurs constater que la concentration intracellulaire en Cu dans cette souche est inférieure à celle mesurée dans la souche CB15N (Fig. 12). Cette donnée peut s'expliquer par le fait que la surexpression de PcoA et PcoB permet de diminuer davantage la concentration intracellulaire en Cu.

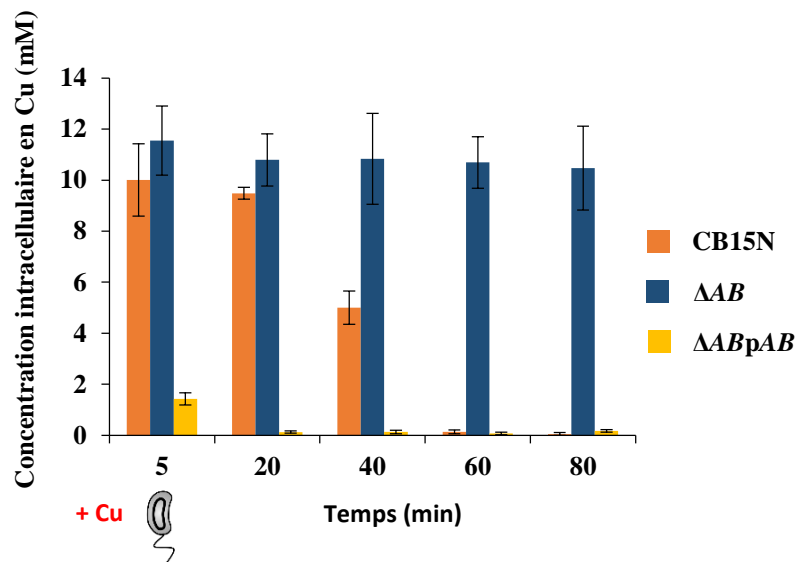


Figure 12 : Mesure de la concentration intracellulaire en Cu dans les souches CB15N, ΔAB et $\Delta ABpAB$ par AAS. Les cellules flagellées ont été traitées avec du Cu et des cellules ont été collectées à différents moments du cycle cellulaire (5, 20, 40, 60 et 80 min).

En résumé, la souche ΔAB est incapable de se diviser en présence de Cu car elle ne parvient pas à diminuer sa concentration intracellulaire en Cu. Ces données suggèrent donc que PcoA et PcoB permettent de diminuer la concentration intracellulaire en Cu afin de permettre la transition G1/S.

2) Transition G2/M :

Les données d'AAS avaient permis de mettre en évidence une première diminution de la concentration intracellulaire en Cu lors de la transition G1/S mais également une seconde au moment de la transition G2/M (Fig. 9A.). Le mécanisme responsable de la seconde diminution de la concentration intracellulaire en Cu, juste avant la transition G2/M, a également été recherché. Etant donné que PcoA et PcoB sont responsables de la première diminution de la concentration intracellulaire en Cu, ils pourraient également être impliqués lors de la seconde diminution.

Cependant, l'analyse WB a révélé que l'expression de PcoA et PcoB n'était pas augmentée au moment de la deuxième diminution de la concentration intracellulaire en Cu, entre 160 et 200 min (Fig. 9B.). Cette diminution ne semble donc pas due à une augmentation de l'expression de PcoA et PcoB mais cela ne signifie pas que PcoA et PcoB ne sont pas impliqués. En effet, PcoA et PcoB pourraient voir leur activité augmenter lors de la transition G2/M, via un mécanisme de contrôle post-traductionnel.

Afin de déterminer si PcoA et PcoB sont impliqués dans la deuxième diminution de la concentration intracellulaire en Cu, la souche ΔAB a été synchronisée et les cellules pédonculées ont été traitées avec du Cu, afin de passer outre le blocage en phase G1 (constaté lors de l'ajout du Cu sur les cellules flagellées). Le contenu en ADN des bactéries au cours du cycle cellulaire a ensuite été déterminé par FACS. Si PcoA et PcoB ne sont effectivement pas impliqués dans la seconde diminution de la concentration intracellulaire en Cu, alors les cellules devraient parvenir à effectuer leur transition G2/M et se diviser. Pourtant, nous pouvons constater que les cellules pédonculées restent figées et ne poursuivent pas leur cycle cellulaire (Fig. 11C).

Ces données suggèrent que PcoA et PcoB pourraient être impliqués dans la seconde diminution de la concentration intracellulaire en Cu. Cependant, les cellules pédonculées de la souche CB15N et de la ΔAB ont été exposées au Cu et leur concentration intracellulaire en Cu a été mesurée par AAS. Cette expérience montre que la concentration intracellulaire en Cu au sein du mutant ΔAB est beaucoup plus élevée que dans la souche CB15N. En conséquence, afin de déterminer si PcoA et PcoB sont effectivement impliqués ou non dans la seconde diminution de la concentration intracellulaire en Cu, les cellules pédonculées des deux souches (CB15N et ΔAB) devraient présenter des concentrations intracellulaires en Cu semblables.

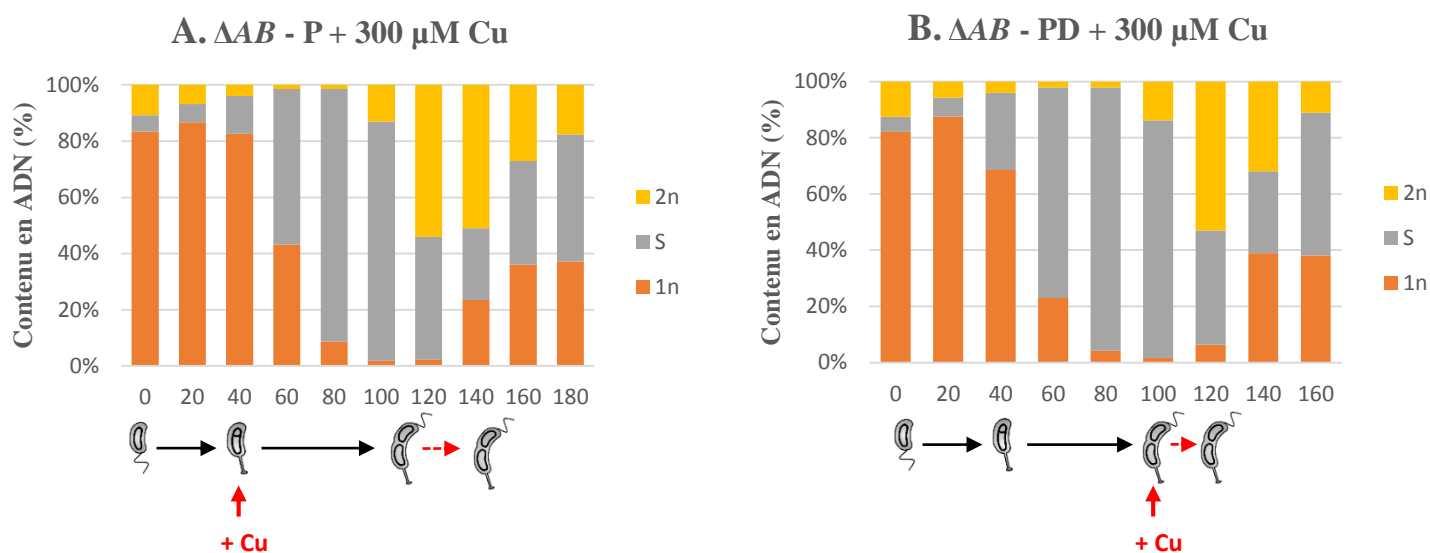


Figure 13 : Détermination du contenu en ADN chez la ΔAB par FACS. (A.) Ajout du Cu sur les cellules pédonculées, 35 min après la synchronisation. (B.) Ajout du Cu sur les cellules pré-divisionnelles, 90 min après la synchronisation.

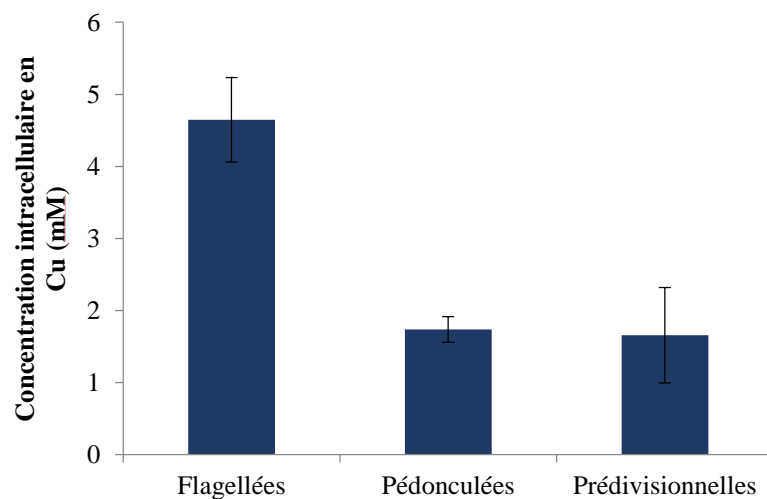


Figure 14 : Mesure de la concentration intracellulaire en Cu chez la souche ΔAB par AAS. Les différents types cellulaires (flagellés, pédonculés et pré-divisionnels) ont été traités pendant 5 min avec 300 μM de Cu.

Les souches CB15N et ΔAB ont été cultivées avec 300 μM et des courbes de croissance ont été réalisées. Cette concentration en Cu n'impacte pas la croissance de la souche CB15N et a un impact modéré sur la croissance de la souche ΔAB .

La souche ΔAB a de nouveau été synchronisée et les cellules pédonculées (T_{35}) ont été traitées avec 300 μM de Cu. Nous avons précédemment montré qu'en absence de Cu, la souche ΔAB se comportait comme la souche CB15N (Fig. 11A.) : la transition G1/S survient après 40 min, la phase G2 débute après 100 min et la transition G2/M a lieu après 120 min. Lors d'une exposition des cellules pédonculées à 300 μM de Cu, la transition G2/M est retardée et survient après 160 min (Fig. 13A.). Un allongement de la transition G2/M est également observé lors du traitement des cellules pré-divisionnelles (T_{90}) (Fig. 13B.). Ce retard de la division pourrait également être expliqué par le fait que la cellule a besoin de diminuer sa concentration intracellulaire en Cu avant de pouvoir se diviser.

Afin de déterminer si le mutant ΔAB réduit sa concentration intracellulaire en Cu au moment de la transition G2/M, les cellules flagellées, pédonculées et pré-divisionnelles ont été exposées à 300 μM de Cu. La concentration intracellulaire en Cu est beaucoup plus faible dans les cellules pédonculées et pré-divisionnelles que dans les cellules flagellées (Fig. 14). De plus, la concentration intracellulaire en Cu ne semble pas varier entre les cellules pédonculées et les cellules pré-divisionnelles, montrant que les cellules ne doivent pas diminuer leur concentration intracellulaire en Cu pour passer en phase G2. Malheureusement, nous n'avons pas les données correspondant au moment de la transition G2/M. Cependant, il a été montré que la souche CB15N devait diminuer sa concentration intracellulaire en Cu jusque 1,5 mM avant de pouvoir se diviser. Etant donné que les cellules pédonculées de la souche ΔAB traitées avec 300 μM montrent une concentration intracellulaire en Cu de 2 mM, les cellules devraient normalement diminuer leur concentration intracellulaire en Cu avant de pouvoir se diviser.

Ces données montrent que lors d'un traitement avec 300 μM de Cu, les cellules ΔAB retardent leur division, ce qui n'est pas le cas des cellules CB15N pour cette même concentration. Ce retard de division peut donc être attribué à l'absence de PcoA et PcoB.

Cependant, ces cellules ΔAB sont tout de même capables de se diviser dans ces conditions, ce qui n'était pas le cas lors d'un traitement avec 1,16 mM de Cu. En effet, à cette concentration plus élevée, les cellules restaient figées et ne poursuivaient pas leur cycle cellulaire. En conclusion, si les cellules ΔAB sont capables de se diviser en retardant leur transition G2/M lors d'un traitement au Cu, un autre système que PcoA et PcoB doit être impliqué dans l'allongement de la transition G2/M en présence de Cu.

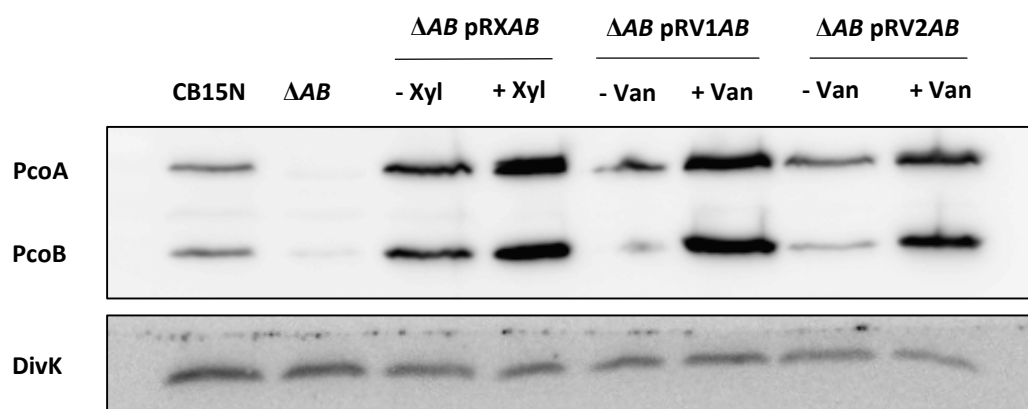


Figure 15 : Détermination de l'expression de PcoA et PcoB dans différentes souches par WB. Les souches inductibles ont été induites avec 0,03% de xylose ou 0,5 mM de vanillate. DivK est utilisé comme contrôle de charge.

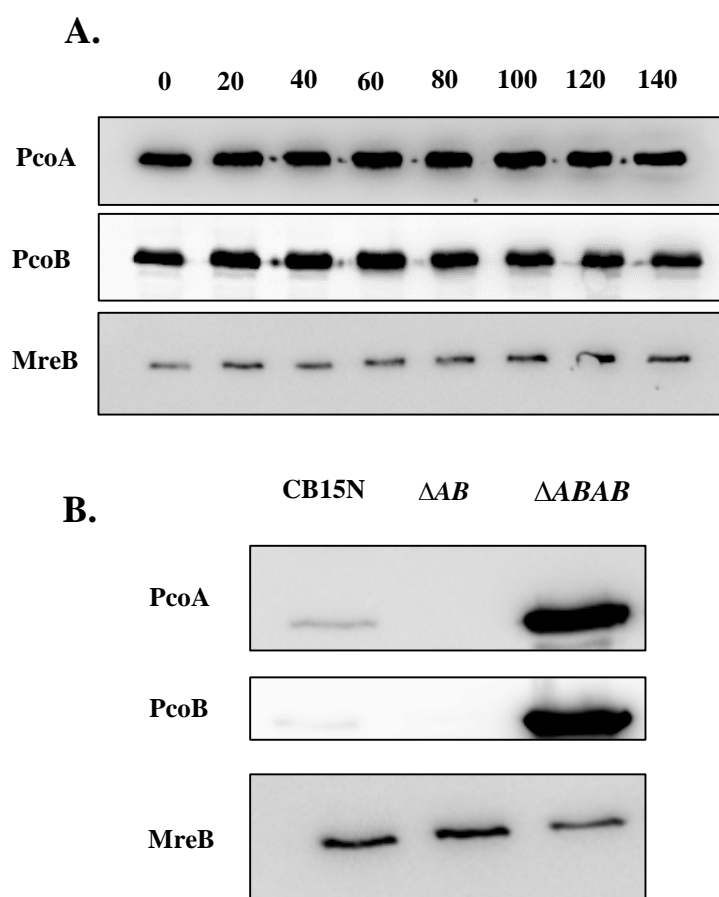


Figure 16 : Détermination de l'expression de PcoA et PcoB par WB. MreB est utilisé comme contrôle de charge. **A.** Les cellules flagellées de la souche $\Delta ABpAB$ ont été traitées au Cu. **B.** Les souches CB15N, ΔAB et $\Delta ABpAB$ ont été traitées au Cu.

Nous avons montré précédemment que la souche CB15N devait diminuer sa concentration intracellulaire en Cu au moment de la transition G2/M afin de pouvoir se diviser. Nous pouvons donc supposer que si la concentration cellulaire en Cu est assez faible avant la transition G2/M, la cellule ne retardera pas sa transition G2/M avant de se diviser. Afin de confirmer cette hypothèse, des souches contenant des promoteurs inductibles ont été utilisées. Ces souches, $\Delta ABpRXAB$, $\Delta ABpRV1AB$ et $\Delta ABpRV2AB$, expriment PcoA et PcoB sous le contrôle d'un promoteur inductible au xylose ou au vanillate. Le but était donc d'ajouter du xylose (ou du vanillate) sur les cellules pré-divisionnelles. Cela permettrait de surexprimer PcoA et PcoB et d'ainsi diminuer artificiellement la concentration intracellulaire en Cu avant la transition G2/M. Cette diminution de la concentration intracellulaire en Cu devrait permettre aux cellules de se diviser sans devoir allonger leur transition G2/M.

Ces souches ont tout d'abord été soumises à un traitement de 1,16 mM de Cu et leurs courbes de croissance ont été déterminées. Étonnamment, en absence de l'inducteur (xylose ou vanillate), ces souches traitées au Cu montrent une croissance semblable à la souche CB15N. L'expression de PcoA et PcoB dans ces souches, ainsi que dans les souches CB15N et ΔAB , a alors été analysée par WB. Nous constatons que PcoA et PcoB sont effectivement exprimés dans la souche CB15N mais absents dans la souche ΔAB (Fig. 15). Dans les souches $\Delta ABpRXAB$, $\Delta ABpRV1AB$ et $\Delta ABpRV2AB$, PcoA et PcoB sont sous le contrôle d'un promoteur inductible et ne devraient donc pas être exprimés en absence de l'inducteur. Cependant, nous pouvons constater qu'il y a pourtant une expression de PcoA et PcoB dans les 3 souches inductibles malgré l'absence de l'inducteur. Ces données montrent donc que PcoA et PcoB sont exprimés durant tout le cycle cellulaire dans ces souches, suggérant une fuite des promoteurs.

En revanche, nous pouvons voir que l'expression de PcoA et PcoB est plus forte lors de la présence de l'inducteur dans la souche $\Delta ABpRV2AB$ (Fig. 15). Il serait donc possible de surexprimer PcoA et PcoB avant la transition G2/M en ajoutant du vanillate. La souche $\Delta ABpRV2AB$ a alors été synchronisée et les cellules flagellées ont été cultivées dans du milieu frais contenant du Cu. Nous avons alors ajouté du xylose dans ce milieu de culture à différents moments avant la transition G2/M. Les bactéries ont été collectées toutes les 20 min pour déterminer leur contenu en ADN au cours du cycle cellulaire par FACS. Cependant, lorsque les cellules flagellées sont traitées avec du Cu et sans xylose, nous ne constatons pas d'allongement de la phase G2/M. Ces données suggèrent donc que l'expression de PcoA et PcoB issue de la fuite du promoteur est suffisante pour surexprimer PcoA et PcoB. Il n'est donc pas possible d'utiliser cette souche afin de surexprimer PcoA et PcoB spécifiquement avant la transition G2/M.

La souche $\Delta ABpAB$ (souche ΔAB complétée avec PcoA et PcoB) a alors été utilisée de manière à surexprimer artificiellement PcoA et PcoB durant tout le cycle cellulaire. Cette surexpression devrait permettre de diminuer la concentration intracellulaire en Cu et permettre une transition G2/M plus rapide. L'expression de PcoA et PcoB dans cette souche a été déterminée par WB et comparée à l'expression de PcoA et PcoB dans la souche CB15N (Fig. 16B.), confirmant que cette souche surexprime effectivement PcoA et PcoB par rapport à la souche CB15N.

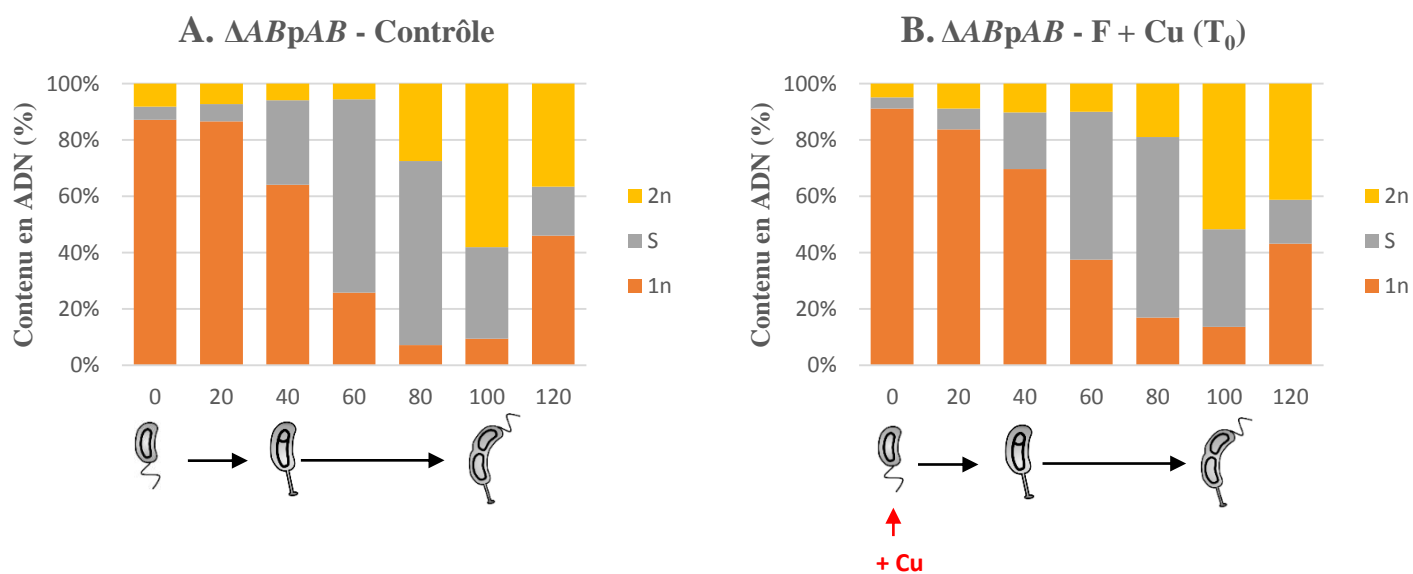


Figure 17 : Détermination du contenu en ADN chez la souche $\Delta ABpAB$ par FACS. (A.) Condition contrôle. (B.) Ajout du Cu sur les cellules flagellées, immédiatement après la synchronisation.

La souche $\Delta ABpAB$ a été synchronisée et les cellules flagellées isolées ont été traitées avec 1,16 mM de Cu. La détermination de l'expression de PcoA et PcoB au cours du cycle cellulaire par WB montre que PcoA et PcoB ne sont pas régulés au cours du cycle cellulaire, contrairement à la CB15N (Fig. 16A.). Il y a donc bien une surexpression constante de PcoA et PcoB tout au long du cycle cellulaire.

Le contenu en ADN au cours du cycle cellulaire a été analysé par FACS. En absence de Cu, la souche $\Delta ABpAB$ se comporte comme la souche CB15N : la transition G1/S a lieu après 40 min et la transition G2/M, après 120 min. Lorsque les cellules flagellées sont traitées avec du Cu, ces dernières se divisent de la même manière (Fig. 17). Aucun allongement des transitions G1/S et G2/M n'est observé. Cette souche se divise donc encore plus rapidement que la souche CB15N en présence de Cu (120 min au lieu de 200). Ces données confirment que si la concentration intracellulaire en Cu diminue rapidement, la division n'est pas retardée.

En conclusion, PcoA et PcoB semblent effectivement responsables de la diminution de la concentration cellulaire en Cu lors de la transition G1/S. Cependant, nous avons montré qu'un autre système devrait également être impliqué lors de la transition G2/M. Nous avons alors décidé de rechercher les acteurs potentiellement impliqués dans l'allongement de la transition G2/M.

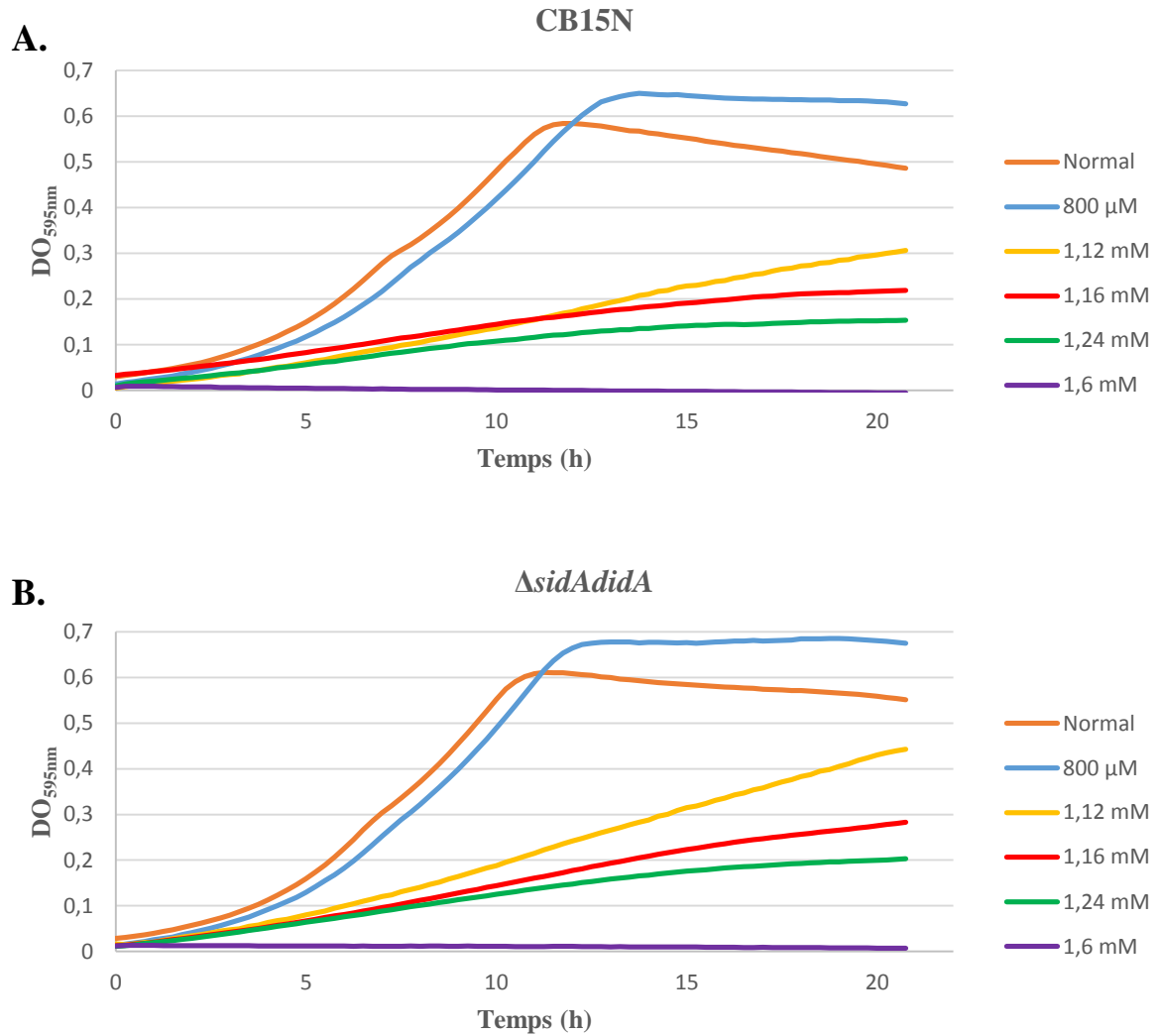


Figure 18 : Courbes de croissance de la souche CB15N (A.) et $\Delta sidAdida$ (B.) en condition contrôle et traitée avec 800 μM ; 1,12mM ; 1,16 mM ; 1,24 mM et 1,6 mM de Cu.

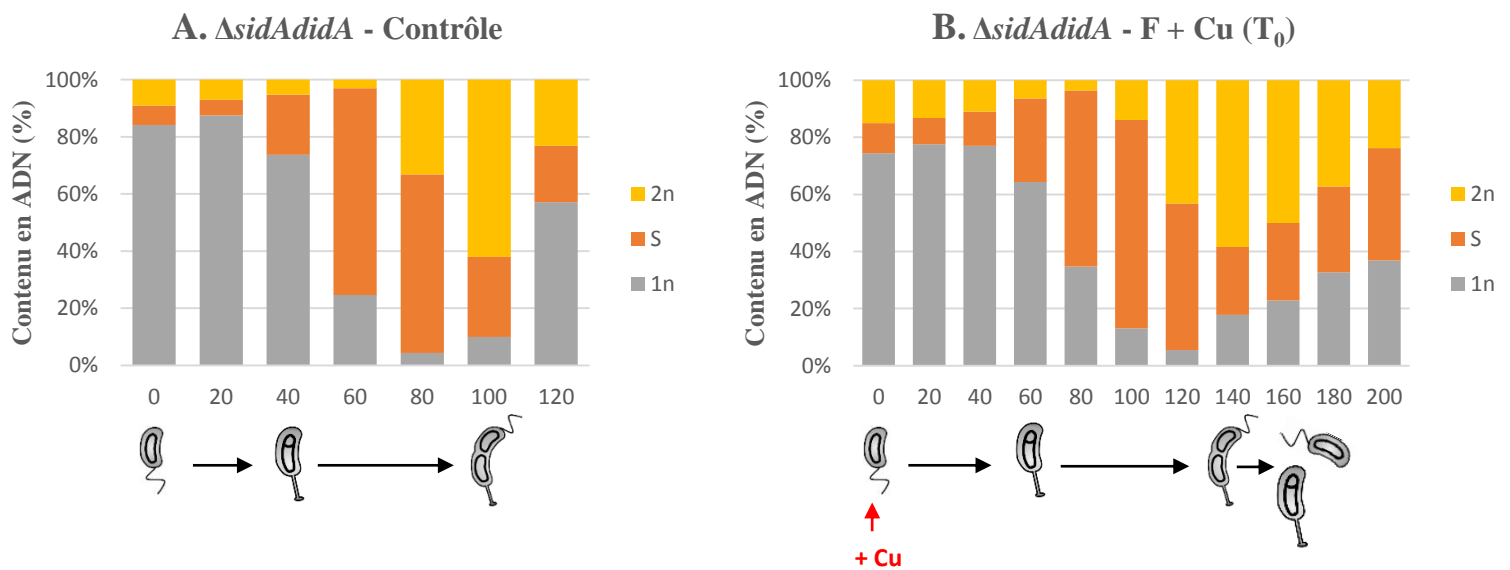


Figure 19 : Détermination du contenu en ADN chez la souche $\Delta sidAdida$ par FACS. (A.) Condition contrôle. (B.) Ajout du Cu sur les cellules flagellées, directement après la synchronisation.

3. Le Cu pourrait agir directement sur la cytokinèse par un système de réponse au stress :

Comme expliqué précédemment, le Cu pourrait induire un stress oxydatif dans la cellule qui pourrait entraîner des dommages à l'ADN. La cellule pourrait donc retarder sa division pour réparer ces dommages afin de ne pas les transmettre à la génération suivante. Nous avons donc décidé de nous intéresser à SidA et DidA qui inhibent la division en réponse à des dommages à l'ADN en interagissant respectivement avec les protéines de division FtsW et FtsN (Modell *et al.*, 2014). Ces deux inhibiteurs pourraient donc intervenir dans l'allongement de la transition G2/M lors d'un traitement au Cu.

Un mutant $\Delta sidAdidA$ se divise de manière prématurée après avoir subi des dommages à l'ADN (Modell *et al.*, 2014). Si le Cu entraîne effectivement des dommages à l'ADN par un stress oxydatif, la souche $\Delta sidAdidA$ devrait également être capable de se diviser plus rapidement que la souche CB15N lors d'un traitement au Cu.

Afin de déterminer la croissance de ce mutant en présence de Cu, la souche $\Delta sidAdidA$ a été traitée avec différentes concentrations en Cu et des courbes de croissance ont été réalisées. Nous pouvons constater que le mutant $\Delta sidAdidA$ montre une meilleure croissance que la souche CB15N lorsqu'il est traité avec du Cu (Fig. 18), suggérant que SidA et DidA pourraient être impliqués dans l'allongement de la division en présence de Cu.

Afin de vérifier que SidA et DidA sont impliqués spécifiquement dans l'allongement de la transition G2/M, la souche $\Delta sidAdidA$ a été synchronisée. Les cellules flagellées ont ensuite été cultivées dans du milieu frais contenant du Cu et le contenu en ADN a été analysé par FACS au cours du cycle cellulaire. En absence de Cu, la transition G1/S arrive après 40 min et la transition G2/M, après 120 min, comme chez la souche CB15N (Fig. 19A.). Lorsque les cellules flagellées sont traitées avec du Cu (Fig. 19B.), la transition G1/S est retardée de 20 min. Cette donnée suggère que SidA et DidA ne sont pas impliqués dans l'allongement de la transition G1/S. La phase S ne semble pas affectée par le traitement au Cu. De manière intéressante, nous constatons que la transition G2/M survient après 160 min. Il y a donc toujours un allongement de la transition G2/M. Cependant, la division survient plus rapidement dans le mutant $\Delta sidAdidA$ que chez la souche CB15N (160 min au lieu de 200 min).

Ces données laissent donc penser que SidA et DidA pourraient être impliqués dans l'allongement de la transition G2/M. Le Cu pourrait donc induire un stress oxydatif qui entraînerait des dommages à l'ADN : SidA et DidA interviendrait alors afin de ralentir la division cellulaire pour que la cellule puisse réparer ces dommages avant de se diviser.

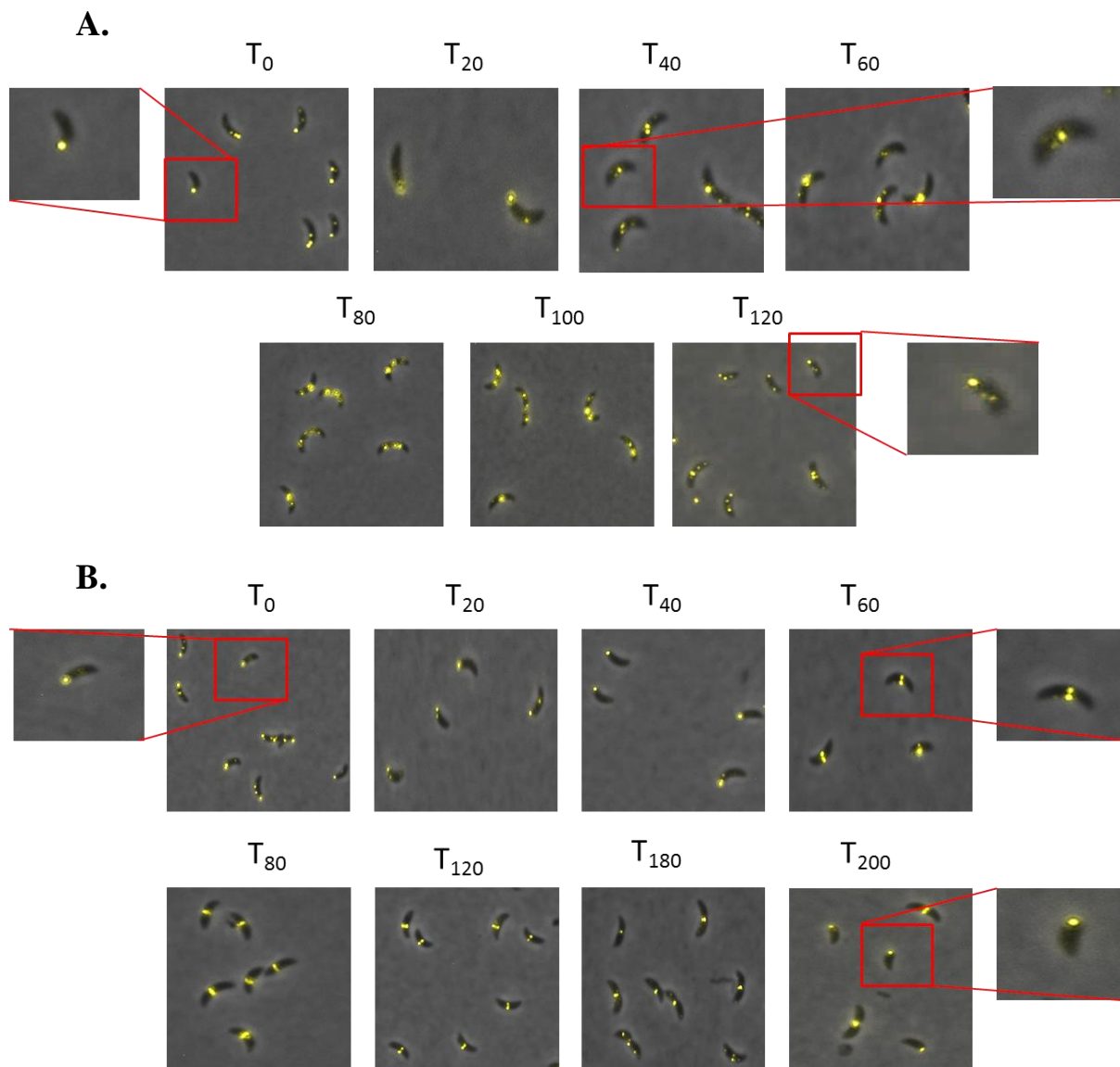


Figure 20 : Localisation de FtsZ-YFP au début du cycle cellulaire par microscopie à fluorescence chez la souche CB15N/*ftsZ*-YFP en absence de Cu (A.) et lorsque les cellules flagellées sont traitées avec du Cu (B.).

4. Le Cu pourrait agir indirectement sur la cytokinèse :

Pour rappel, lors de la cytokinèse, de nombreuses protéines se localisent au centre de la cellule, là où s'est formé l'anneau Z, dans un ordre bien précis. En cas de stress, les bactéries peuvent retarder leur division en empêchant ces protéines de se localiser au centre de la cellule. Le Cu pourrait donc agir de manière indirecte en retardant la localisation d'une de ces protéines de division chez *C. crescentus*.

Une des premières protéines à arriver au centre de la cellule est la protéine FtsZ qui permet la formation de l'anneau Z, la première étape de la division. Afin de déterminer si le Cu entraîne un retard dans la localisation de cette protéine au centre de la cellule, nous avons utilisé la souche CB15N/*ftsZ*-YFP. Cette souche contient une copie supplémentaire de *ftsZ* fusionné avec la YFP, sous le contrôle d'un promoteur inducible au xylose, afin de pouvoir observer sa localisation par microscopie à fluorescence.

La souche CB15N/*ftsZ*-YFP a été synchronisée et les cellules flagellées ont été cultivées dans un milieu contenant du Cu. Les bactéries ont ensuite été collectées toutes les 20 min et immédiatement observées par microscopie à fluorescence.

Immédiatement après la synchronisation, toutes les bactéries montrent une localisation polaire de FtsZ. En absence de Cu, FtsZ-YFP se localise au centre de la cellule après 40 min (Fig. 20A.). Lorsque les cellules flagellées sont traitées au Cu (Fig. 20B.), FtsZ-YFP se localise au centre de la cellule après 60 min. Ces données montrent donc que le Cu induit un retard dans la localisation de FtsZ au centre de la cellule. En absence de Cu, nous pouvons observer une localisation polaire de FtsZ après 120 min et, lors d'un traitement au Cu, après 200 min, ce qui correspond bien au moment de la transition G2/M où de nouvelles cellules flagellées apparaissent.

Ces données ont également été analysées afin de déterminer le nombre de cellule possédant une localisation polaire et centrale de FtsZ-YFP. Cette analyse confirme qu'en absence de Cu, FtsZ-YFP se localise majoritairement au centre de la cellule après 40 min (Fig. 21A.) tandis que lors d'un traitement au Cu, cette localisation centrale est retardée et a lieu après 60 min (Fig. 21B.).

Cette expérience suggère donc que le Cu peut entraîner un retard de la localisation de FtsZ au centre de la cellule et ainsi retarder la division.

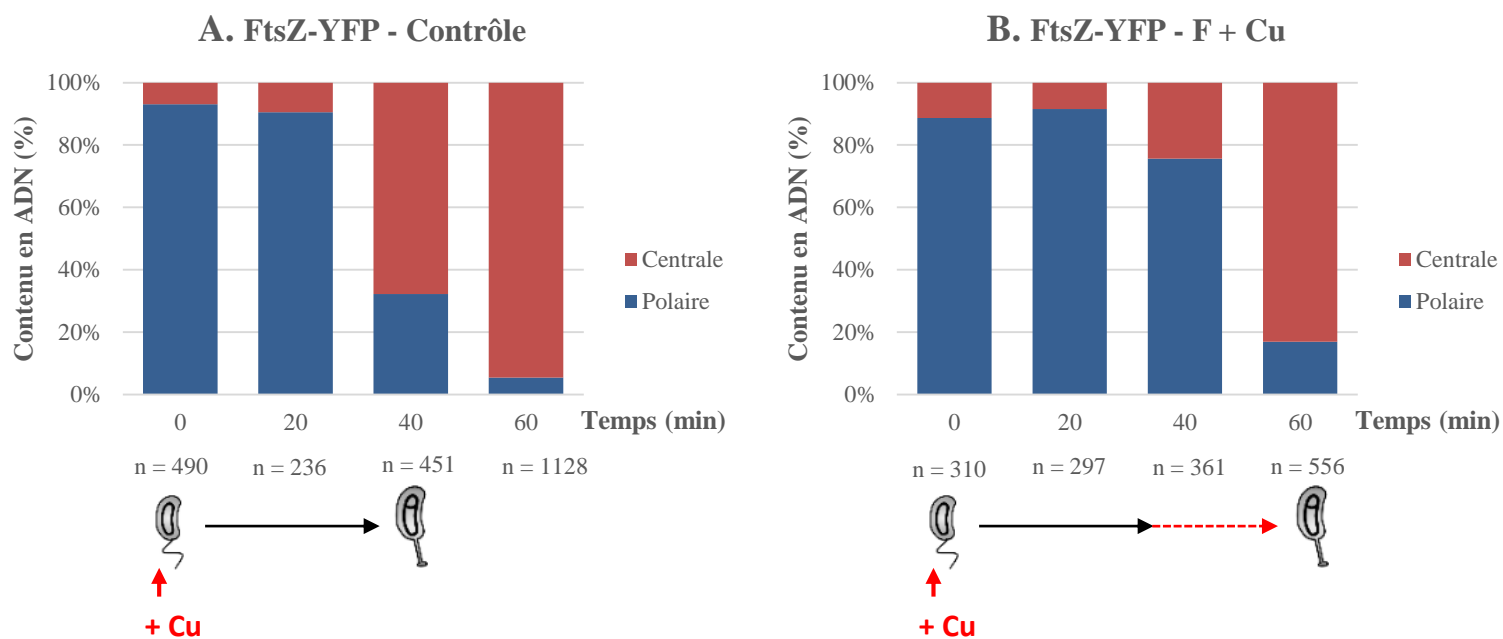


Figure 21 : Nombre relatif de bactéries présentant une localisation de FtsZ-YFP polaire ou centrale. (A.) En absence de Cu. (B.) Traitement des cellules flagellées avec du Cu.

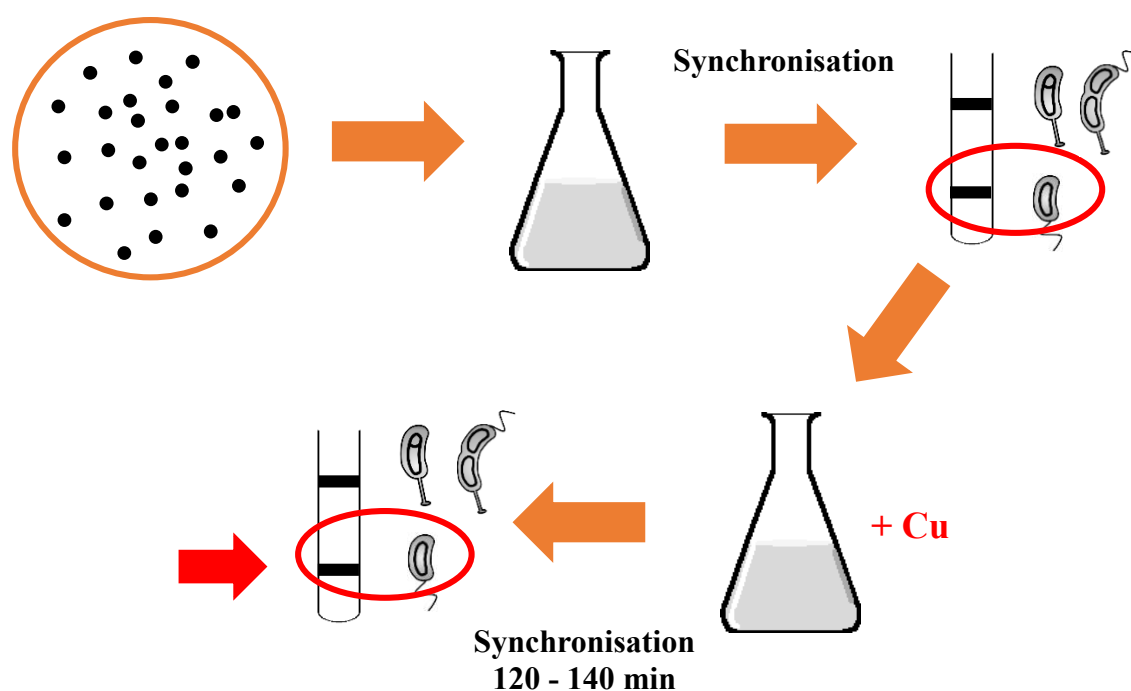


Figure 22 : Représentation schématique de la double synchronisation

5. Recherche d'acteurs impliqués dans l'allongement de la transition

G2/M :

Etant donné que PcoA et PcoB ne semblent pas impliqués dans l'allongement de la transition G2/M, nous voulions rechercher d'autres acteurs qui pourraient être impliqués dans cet allongement. Pour cela, nous avons décidé de réaliser un crible génétique sur une banque de mutants transpositionnels dans le but d'identifier un mutant qui ne montrerait pas d'allongement de la transition G2/M en présence de Cu et qui serait donc capable de se diviser plus rapidement que la souche CB15N.

Notre première idée pour la réalisation de ce crible était de cultiver l'ensemble des mutants issus de la mutagenèse et de les synchroniser (Fig. 22). Les cellules flagellées (provenant des différents mutants) auraient ensuite été remises en culture dans un milieu contenant du Cu. Afin d'obtenir des mutants qui se divisent plus rapidement que la souche CB15N, nous aurions réalisé une seconde synchronisation après 120 ou 140 min dans le but d'isoler des cellules flagellées issues d'une division cellulaire précoce.

Afin de déterminer si la double synchronisation était possible, nous avons synchronisé la souche CB15N. Les cellules flagellées ont été cultivées dans un milieu frais sans Cu et une deuxième synchronisation a été réalisée après la division des bactéries (après 120 min). Nous avons réussi à isoler de nouveau les cellules flagellées, démontrant la possibilité d'une double synchronisation.

Malheureusement, en présence de Cu, nous n'avons pas réussi à isoler les cellules flagellées au temps 200 min (correspondant à la division cellulaire), suggérant que le Cu modifie la densité des cellules.

Cependant, étant donné qu'un traitement au Cu entraîne un retard de la division indépendamment du type cellulaire traité, nous avons tenté de réaliser de nouveau cette double synchronisation mais en ajoutant le Cu sur les cellules pré-divisionnelles (90 min après la première synchronisation). De cette manière, les cellules seraient exposées moins longtemps au Cu et leur densité pourrait ne pas être trop modifiée. Malheureusement, cela ne nous a pas permis d'isoler les cellules flagellées.

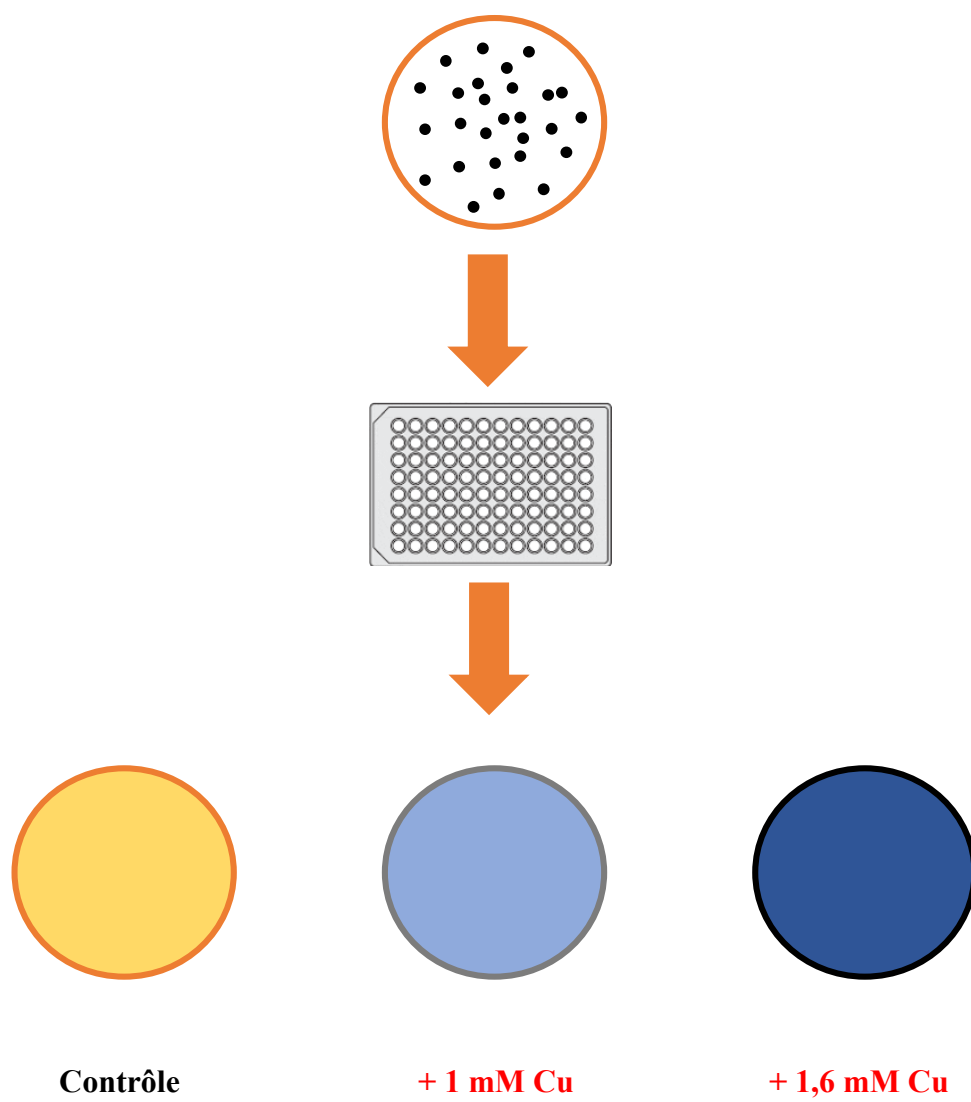


Figure 23 : Représentation schématique du crible.

Etant donné que la double synchronisation n'est pas réalisable en présence de Cu, nous avons décidé d'utiliser une autre approche. Pour cela, les mutants issus de la mutagenèse transpositionnelle ont été mis en culture sans Cu en plaques 96 puits (Fig. 23). Ils ont ensuite été triés sur 3 boîtes : une sans Cu, une contenant 1 mM de Cu et une contenant 1,6 mM de Cu. Le but était de trouver des mutants plus résistants au Cu que la souche CB15N et donc, capables de pousser à 1,6 mM ou capables de pousser plus rapidement que la souche CB15N à 1 mM. Malheureusement, aucun mutant présentant ce phénotype n'a été détecté. Cependant, les mutants issus de la mutagenèse transpositionnelle n'ont pas tous été testés. En effet, seulement 968 mutants transpositionnels ont été testés.

Conclusion et Perspectives

Conclusions et Perspectives

Lors d'une exposition au Cu, *C. crescentus* retarde sa division en allongeant la transition G1/S (différenciation des cellules flagellées en cellules pédonculées) ainsi que la transition G2/M (division des cellules pré-divisionnelles). L'allongement des transitions G1/S et G2/M est lié à la concentration intracellulaire en Cu de la bactérie. En effet, la cellule doit diminuer une première fois sa concentration intracellulaire en Cu au moment de la transition G1/S afin de permettre l'initiation de la réplication de l'ADN. Ensuite, elle diminue une seconde fois sa concentration intracellulaire en Cu, au moment de la transition G2/M, afin de permettre la division et indiquant ainsi que la concentration intracellulaire en Cu tolérée pour permettre l'initiation de la réplication de l'ADN est toujours trop élevée pour autoriser la division cellulaire. La cellule retarde donc ces transitions G1/S et G2/M afin de diminuer sa concentration intracellulaire en Cu.

Les acteurs responsables de la première diminution de la concentration intracellulaire en Cu sont les protéines PcoA et PcoB, impliquées dans l'homéostasie du Cu. PcoA est une multi-copper oxydase périplasmique pouvant oxyder le Cu^+ en Cu^{2+} en présence d' O_2 . PcoB est localisé dans la membrane externe et est prédit pour être une pompe à efflux permettant la sortie du Cu dans le milieu extracellulaire. Lors d'un traitement au Cu, la croissance de la souche ΔAB est bloquée : les cellules ne peuvent pas poursuivre leur cycle cellulaire. De plus, la concentration intracellulaire en Cu dans cette souche ΔAB est plus élevée que dans la souche CB15N et ne diminue pas au cours du temps, confirmant l'importance de PcoA et PcoB dans la diminution de la concentration intracellulaire en Cu. Cependant, lors d'un traitement avec une concentration de Cu plus faible (300 μM), la souche ΔAB est tout de même capable de se diviser, suggérant qu'un autre système que PcoA et PcoB doit également être impliqué.

Nous avons montré que la cellule flagellée de la souche ΔAB traitée avec 300 μM de Cu avaient une concentration intracellulaire en Cu plus importante que les cellules pédonculées et pré-divisionnelles, suggérant une diminution de la concentration intracellulaire en Cu au moment de la transition G1/S. Cependant, une autre expérience pourrait être réalisée afin de montrer la diminution de la concentration intracellulaire en Cu au cours du cycle cellulaire. Pour cela, la souche ΔAB devrait être synchronisée et les cellules flagellées isolées devraient être remises en culture avec 300 μM de Cu. Des échantillons devraient être pris tout au long du cycle cellulaire afin d'être analysés par AAS. Ainsi, nous pourrions voir si la concentration intracellulaire en Cu descend progressivement jusque 60 min (transition G1/S) et si une seconde diminution a bien lieu après 200 min (transition G2/M). Cela confirmerait qu'un autre mécanisme que PcoA et PcoB peut intervenir afin de diminuer la concentration intracellulaire en Cu.

De plus, les données d'AAS nous ont montré que les cellules pédonculées de la souche CB15N traitées avec 1,16 mM de Cu ont une concentration intracellulaire en Cu de 2,8 mM. Les cellules pédonculées de la souche ΔAB traitées avec 300 μ M de Cu présentent quant à elles, une concentration intracellulaire en Cu de 2mM. Il serait donc intéressant de trouver une concentration de Cu permettant d'obtenir des cellules pédonculées de la souche ΔAB avec une concentration intracellulaire en Cu proche de 2,8 mM. Ainsi, les cellules pédonculées des 2 souches seraient dans les mêmes conditions et nous pourrions donc les comparer.

Les souches inductibles $\Delta ABpRXAB$, $\Delta ABpRV1AB$ et $\Delta ABpRV2AB$ devaient être utilisées pour confirmer qu'une diminution de la concentration intracellulaire en Cu avant la transition G2/M permettrait à la cellule de se diviser sans allonger sa transition G2/M. Cependant, à cause d'une fuite des promoteurs, cette expérience n'a pas pu être réalisée. Afin de réaliser cette expérience, nous pourrions créer une souche ΔAB en intégrant PcoA et PcoB au niveau du promoteur inductible au xylose sur le chromosome. Cela pourrait peut-être empêcher la surexpression de PcoA et PcoB au cours du cycle cellulaire et nous permettre de surexprimer leur expression spécifiquement avant la transition G2/M afin de diminuer la concentration intracellulaire en Cu.

Chez *E. coli*, 3 systèmes de détoxification du Cu ont été décrits : le système Cue, Cus et Pco. L'analyse *in silico* entre *E. coli* et *C. crescentus* avait montré que de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie du Cu chez *E. coli* étaient conservés chez *C. crescentus*. Cependant, nous nous sommes uniquement intéressés au système Pco. Nous pourrions donc également étudier d'autres gènes impliqués dans l'homéostasie du Cu afin de déterminer s'ils sont impliqués dans la transition G2/M.

Nous avons montré que le système de réponse au stress SidA et DidA pourrait être impliqué dans l'allongement de la transition G2/M. En effet, le Cu pourrait induire un stress oxydatif entraînant des dommages au niveau de l'ADN. Une perspective intéressante serait de vérifier si le Cu entraîne effectivement des dommages à l'ADN en tentant de détecter des cassures dans l'ADN. Afin de déterminer si le Cu entraîne un stress oxydatif, il serait également intéressant de déterminer l'expression des gènes impliqués dans la réponse SOS. Nous pourrions déterminer l'expression de RecA et LexA par qRT-PCR. Si leur expression augmente lors d'un traitement au Cu, cela suggérerait que le Cu induit effectivement un stress oxydatif. De plus, nous pourrions déterminer l'expression de SidA et DidA par qRT-PCR. Si leur expression augmente lors d'un traitement au Cu, cela indiquerait que le Cu pourrait induire leur expression. Si SidA et DidA sont effectivement induits lors d'un stress au Cu, cela suggérerait qu'ils pourraient être impliqués dans l'allongement de la division en présence de Cu. Nous pourrions peut-être aussi déterminer à quel moment du cycle cellulaire leur expression augmente afin de déterminer s'ils sont impliqués lors de la transition G1/S ou G2/M.

Nous avons également montré que le Cu entraînait un retard de la protéine de division FtsZ. Cependant, FtsZ intervient dans les premières étapes de la division. Il serait donc intéressant de voir si le Cu entraîne également un retard dans la localisation des protéines de division plus tardives comme FtsN, FtsI et FtsW. FtsW appartient à la famille des SEDS (Shape, Elongation, Division, Sporulation). Ces protéines fonctionnent toujours avec une transpeptidase, aussi connue sous le nom de penicillin-binding protein (PBP). La transpeptidase associée à FtsW est la protéine de division FtsI (ou PBP3) (Mercer and Weiss, 2001).

De plus, étant donné que SidA et DidA retardent la division en interagissant respectivement avec les protéines de division FtsW et FtsN, il serait intéressant de regarder leur localisation dans la souche *ΔsidAdidA*. En effet, en présence de Cu, SidA et DidA pourraient interagir avec FtsW et FtsN et ainsi allonger la transition G2/M en empêchant la cellule de terminer l'assemblage de son divisome. En vérifiant la localisation de FtsW et FtsN dans la souche CB15N traitée au Cu, nous pourrions déterminer si ces protéines présentent un retard de localisation. Dans ce cas, si nous exposons la souche *ΔsidAdidA* au Cu, alors nous pourrions peut-être détecter que la localisation de FtsW et FtsN ne serait plus retardée.

Nous avons finalement décidé de rechercher d'autres acteurs pouvant être impliqués dans l'allongement de la transition G2/M en présence de Cu. Pour cela, nous avons réalisé un crible afin de trouver des mutants plus résistants au Cu que la souche CB15N. Cependant, notre première idée de crible, la double synchronisation, ne fonctionne pas en présence de Cu. Normalement, les cellules pédonculées et pré-divisionnelles sécrètent une capsule polysaccharidiques que ne possèdent pas les cellules flagellées. En cas de stress, ces cellules flagellées pourraient cependant être capables de sécréter cette capsule. Il a été montré que lorsque les cellules flagellées produisent cette capsule, elles ne sont plus synchronisables (Ardissonne *et al.*, 2014). Le stress d'un traitement au Cu pourrait donc induire la production de cette capsule dans les cellules flagellées à la fin de la première synchronisation. Cela permettrait d'expliquer pourquoi la synchronisation de bactéries n'est plus possible après un traitement au Cu. Nous pourrions tenter de confirmer cela en mettant le gène, codant pour l'inhibiteur de la formation de la capsule, sous le contrôle d'un promoteur inductible. Ainsi, cette souche serait synchronisée et nous ajouterions l'inducteur au niveau des cellules pré-divisionnelles. Cela pourrait permettre d'empêcher la formation de la capsule dans les cellules flagellées et il serait alors possible de les isoler par synchronisation.

La technique employée pour le crible ne nous a malheureusement pas permis de trouver des candidats intéressants. Cependant, il est important de noter que tous les mutants issus de la mutagenèse transpositionnelle n'ont pas pu être testés. Il serait donc intéressant de continuer ce crible sur les autres mutants. Si un candidat intéressant était identifié, il faudrait en premier lieu créer une souche délétante pour le gène concerné afin de confirmer que l'effet observé dans ce mutant transpositionnel est bien dû à l'insertion du transposon dans ce gène.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Souches et plasmides :

Les souches de *C. crescentus* ont été cultivées à 30°C dans de l'Hutner base-imidazole-buffered-glucose-glutamate (HIGG) avec une concentration en phosphate modérée (0,2 mM) (Poindexter, 1978) avec 5 µg/ml de kanamycine si nécessaire. Les souches inductibles ont été cultivées avec 0,03% de xylose ou 0,5 mM de vanillate.

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37°C dans du Luria-Bertani (LB). De l'ampicilline (100 µg/ml) a été rajoutée si nécessaire.

Souches et Plasmides

Souches	Description
<i>C. crescentus</i>	
CB15N	CB15N ou NA1000, variant synchronisable de la souche CB15
ΔAB	CB15N ΔpcoAB
ΔAB pAB	CB15N ΔpcoAB /pMR10pcoAB
ΔAB pRXAB	CB15N ΔpcoAB /pRXpcoAB
ΔAB pRV1AB	CB15N ΔpcoAB /pV1pcoAB
ΔAB pRV2AB	CB15N ΔpcoAB /pV2pcoAB
WT/ftsZ-YFP	CB15N pRXftsZ - YFP
ΔsidA	CB15N ΔsidA
ΔdidA	CB15N ΔdidA
ΔsidAdidA	CB15N ΔsidAdidA
<i>E. coli</i>	

S17-1	RP4-2, Tc::Mu, KM-Tn7, souche utilisée pour la conjugaison
-------	--

Plasmides	Description
pMR10	Plasmide répliatif à faible copie
pRX	Plasmide à faible copie inductible au xylose
pRV	Plasmide à faible copie inductible au vanillate

2. Milieux :

Milieu pauvre pour *C. crescentus* : HIGG (Hutner base-imidazole-buffered-glucose-glutamate)

HIGG	
Volume	Composants
5 ml	Imidazole, 1 M, pH 7
20 ml	Hutner base
15 ml	Glucose, 10%
7,5 ml	Acide glutamique, 20%
8,9 ml	NH ₄ Cl, 1 M
2 ml	Phosphate, 0,1 M
15 g	Agar (si milieu solide)
1 l	ddH ₂ O

Milieu riche pour *C. crescentus* : PYE (Peptone Yeast Extract)

PYE	
Volume	Composants
2 g	Bacto-peptone
10 g	Yeast extract
2 ml	MgSO ₄ , 0,5 M
1 ml	CaCl ₂ , 0,5 M
15 g	Agar (si milieu solide)
1 l	dH ₂ O

Milieu riche pour *E. coli* : LB (Luria-Bertani)

LB	
Volume	Composants
10 g	Bacto-peptone
5 g	Yeast Extract
10 g	NaCl
15 g	Agar (si milieu solide)
1 l	dH ₂ O

3. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries :

1) Synchronisation des bactéries :

Les cellules flagellées sont isolées par centrifugation dans un gradient de silicates (Ludox) comme décrit dans (Evinger and Agabian, 1977). Les cellules flagellées synchronisées sont ensuite mises en culture dans du milieu HIGG frais avec du Cu si nécessaire.

2) Détermination des courbes de croissance :

Les cultures de la veille sont diluées dans de l'HIGG frais à une DO_{660nm} de 0,1 et mises en culture à 30°C dans des plaques 96 puits sous agitation constante avec différentes concentrations en Cu et de la kanamycine si nécessaire. La DO_{595nm} est mesurée toutes les 15 min pendant 24 h par un spectrophotomètre BioTek ELx808.

3) Détermination du contenu en ADN par cytométrie de flux (FACS) :

Les bactéries sont fixées dans de l'éthanol froid à 77% avant les étapes suivantes :

- Laver 1 ml de cellules fixées avec 1 ml de FACS Staining Buffer (10 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 1 mM EDTA ; 50 mM NaCitrate ; 0.01% TritonX-100)
- Centrifuger 3 min à 8000 rpm et resuspendre le culot dans 1 ml de FACS Staining Buffer contenant 5 µl d'une solution de RNaseA (20 mg/ml)
- Incuber 30 min à RT
- Centrifuger 3 min à 8000 rpm et resuspendre le culot dans 1 ml de FACS Staining Buffer contenant 0.1 µl de Sytox Green (2 mM, Life Technologies)

Les cellules marquées sont ensuite analysées par un cytomètre de flux BD FACSCalibur. Les données générées sont analysées avec le logiciel CellQuest Pro.

4) Western Blot (WB) :

- Centrifuger les cultures de bactéries 3 min à 8000 rpm et resuspendre le culot avec du SDS-PAGE loading buffer
- Faire bouillir les échantillons 10 min à 99°C avant de les centrifuger quelques secondes à 12 000 rpm
- Charger les échantillons sur un gel de polyacrylamide à 12%

Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane en nitrocellulose avant le marquage par les anticorps.

- Bloquer les membranes 30 min dans du PBST contenant 5% de lait
- Incuber les membranes 1 h 30 avec les anticorps primaires (1/500 anticorps anti-PcoA, 1/500 anticorps anti-PcoB, 1/5000 anticorps anti-MreB, 1/2500 anticorps anti-CtrA, 1/10000 anti-DivK) dans du PBST contenant 2% de lait
- Laver 3 fois les membranes pendant 5 min dans du PBST
- Incuber les membranes 45 min avec les anticorps secondaires (1/10 000 anticorps anti-lapin) dans du PBST contenant 2% de lait
- Laver 3 fois les membranes pendant 5 min dans du PBST

Les membranes sont ensuite révélées par un Image Quant Luminescent Image Analyzer 4 000 (GE Healthcare).

5) Microscopie à fluorescence :

Les bactéries sont immobilisées sur un pad d'HIGG contenant 1% d'agarose. La microscopie à fluorescence est effectuée à l'aide d'un microscope Zeiss Axio Imager.Z1 équipé d'un objectif Zeiss 100X/1.3 Oil Ph3 et de filtres appropriés. Les images sont collectées à l'aide d'une caméra digitale Hanamatsu C11440. Toutes les images et analyses sont effectuées avec le logiciel Zen Pro 2012 (version bleue).

6) Spectrométrie d'absorption atomique (AAS) :

- Centrifuger les bactéries 5 min à 8000 rpm
- Fixer les bactéries pendant 20 min à 4°C dans du paraformaldéhyde à 2%
- Laver 3 fois les cellules à 4°C dans du tampon de lavage (10 mM Tris pH 6,8 ; 100 µM EDTA)
- Lyser les cellules dans du HNO₃ à 1 M en utilisant le Constant cell disruption system (pression de 2,4 kbar)

Le taux de Cu dans le lysat est mesuré en triplicats techniques en utilisant un spectrophotomètre d'absorption atomique Shimadzu AA-7000F.

7) Mutagenèse transpositionnelle :

La banque de mutants a été réalisée par mutagenèse transpositionnelle à l'aide du transposon Mini-Tn5 (Kan^R). Ce transposon a été introduit dans la souche CB15N de *C. crescentus*.

- La veille, lancer en culture la souche donneuse du Mini-Tn5 dans du milieu LB avec Kan à 37°C ainsi que la souche receveuse de *C. crescentus* dans du milieu PYE à 30°C
- Mixer 50 µl de la souche donneuse et 950 µl de la souche receveuse
- Centrifuger pendant 2 min à 9000 rpm
- Enlever le surnageant et ajouter 1 ml de PYE
- Centrifuger pendant 2 min à 9000 rpm
- Enlever un maximum de surnageant et resuspendre le culot dans 50 µl
- Mettre la goutte sur une boîte PYE-Agar
- Incuber à 30°C pendant la nuit
- Resuspendre la goutte dans 2 ml de PYE
- Mettre 100 µl dans une vingtaine de boîtes PYE contenant de l'acide nalidixique et de la kanamycine
- Incuber à 30°C pendant quelques jours

Bibliographie

Bibliographie

- Ardissone, S., Fumeaux, C., Bergé, M., Beaussart, A., Théraulaz, L., Radhakrishnan, S., Dufrêne, Y., Viollier, P. (2014). Cell cycle constraints on capsulation and bacteriophage susceptibility. *eLife Microbiology and infectious disease* 2014 ;3 :e03587
- Bondarczuk, K., Piotrowska-Seget, Z. (2013). Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biol Toxicol* (2013) 29:397-405
- Britos, L., Abeliuk, E., Taverner, T., Lipton, M., McAdams, H., Shapiro, L. (2011). Regulatory Response to Carbon Starvation in *Caulobacter crescentus*. *PLoS ONE*, April 2011, Vol. 6, Issue 4
- Curtis, P., Brun, Y. (2010). Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Mars. 2010, p. 13-41
- Djoko, K., Xiao, Z., Wedd, A. (2008). Copper Resistance in *E. coli*: The Multicopper Oxidase PcoA catalyzes Oxidation of Copper(I) in CuICuII-PcoC. *ChemBioChem* 2008, 9, 1579-1582
- Errington, J. (2003). REGULATION OF ENDOSPORE FORMATION IN *BACILLUS SUBTILIS*. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 1, November 2003, p.117-126
- Evinger, M., Agabian, N. (1977). Envelope-Associated Nucleoid from *Caulobacter crescentus* Stalked and Swarmer Cells. *Journal of Bacteriology*, Oct. 1977, Vol. 132, No. 1, p. 294-301
- Goley, E., Yeh, Y., Hong, S., Fero, M., Abeliuk, E., McAdams, H., Shapiro, L. (2011). Assembly of the *Caulobacter* cell division machine. *Molecular Microbiology* (2011), 80 (6), p. 1680-1698
- Grass, G., Rensing, C. (2001). CueO Is a Multi-copper Oxidase That Confers Copper Tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286, 902-908 (2001)
- Jonas, K., Liu, J., Chien, P., Laub, M. (2013). Proteotoxic Stress Induces a Cell-Cycle Arrest by Stimulating Lon to Degrade the Replication Initiator DnaA. *Cell* 154, August 1, 2013, p. 623-636
- Kimura, T., Nishioka, H. (1997). Intracellular generation of superoxide by copper sulphate in *Escherichia coli*. *Mutation Research* 389 (1997) 237-242
- Kojetin, D., Thompson, R., Benson, L., Naylor, S., Waterman, J., Davies, K., Opperman, C., Stephenson, K., Hoch, J., Cavanagh, J. (2005). Structural analysis of divalent metals binding to the *Bacillus subtilis* response regulator Spo0F: the possibility for in vitro metalloregulation in the initiation of sporulation. *BioMetals* (2005) 18:449-466
- Kumar, K., Mella-Herrera, R., Golden, J. (2009) Cyanobacterial Heterocysts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009 ; 2:a000315

- Laub, M., Chen, S., Shapiro, L., McAdams, H. (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. PNAS, April 2, 2002, Vol. 99, No. 7, p. 4632-4637
- Lee, S., Grass, G., Rensing, C., Barrett, S., Yates, C., Stoyanov, J., Brown, N. (2002). The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications 295 (2002) 616-620
- Lutkenhaus, J., Pichoff, S., Du, S. (2012). Bacterial Cytokinesis: From Z Ring to Divisome. Cytoskeleton, October 2012, 69:778-790
- Macomber, L., Imlay, J. (2008). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. PNAS, May 19, 2009, Vol. 106, No. 20, 8344-8349
- Mah, T., O'Toole, G. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. TRENDS in Microbiology, Vol. 9, No. 1, January 2001, p. 34-39
- Mercer, K., Weiss, D. (2001). The *Escherichia coli* Cell Division Protein FtsW Is Required To Recruit Its Cognate Transpeptidase, FtsI (PBP3), to the Division Site. Journal of Bacteriology, Feb. 2002, p. 904-912
- Modell, J., Kambara, T., Perchuk, B., Laub, M. (2014). A DNA Damage-Induced, SOS-Independent Checkpoint Regulates Cell Division in *Caulobacter crescentus*. PLOS Biology, October 2014, Volume 12, Issue 10
- Osman, D., Cavet, J. (2008). Copper Homeostasis in Bacteria. Advances in Applied Microbiology, Volume 65, Chapter 8, p. 217-247
- Outten, F., Huffman, D., Hale, J., O'Halloran, T. (2001). The Independent *cue* and *cus* Systems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, August 17, pp. 20670-30677
- Poindexter, J. (1978). Selection for nonbuoyant morphological mutants of *Caulobacter crescentus*. J. Bacteriol. 135, 1141-1145
- Rensing, C., Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. FEMS Microbiology Reviews 27 (2003) 197-213
- Singh, S., Grass, G., Rensing, C., Montfort, W. (2004). Cuprous Oxidase Activity of CueO from *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, Nov. 2004, Vol. 186, No. 22, p. 7815-7817
- Solioz, M., Abicht H., Mermoud, M., Mancini, S. (2010). Response of Gram-positive bacteria to copper stress. J. Biol. Inorg. Chem. (2010), 15:3-14
- Strobel, W., Möll, Kiekebusch, D., Klein, K., Thanbichler, M. (2014). Function and Localization Dynamics of Bifunctional Penicillin-Binding Proteins in *Caulobacter crescentus*. Journal of Bacteriology, April 2014, Vol. 196, No 8, p. 1627-1639
- Trevors, J.T., Cotter, C.M. (1989) Copper toxicity and uptake in microorganisms. Journal of Industrial Microbiology, 6 (1990) 77-84
- Wang, L., Khattar, M., Donachie, W., Lutkenhaus, J. (1998). FtsI and FtsW Are Localized to the Septum in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, June 1998, p. 2810-2816